

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Hans Linser

**DER EINFLUSS DER KALIUMERNÄHRUNG
VON LEGUMINOSEN AUF DIE BINDUNG
VON MOLEKULAREM STICKSTOFF
IHRER KNÖLLCHENBAKTERIEN**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades bei
dem Fachbereich 19 Ernährungswissenschaften der
Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Mohammad-Reza Haghparast-Tanha
aus Rascht/Iran

Gießen, im Juli 1973

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Hans Linser

**DER EINFLUSS DER KALIUMERNÄHRUNG
VON LEGUMINOSEN AUF DIE BINDUNG
VON MOLEKULAREM STICKSTOFF
IHRER KNÖLLCHENBAKTERIEN**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades bei
dem Fachbereich 19 Ernährungswissenschaften der
Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Mohammad-Reza Haghparast-Tanha
aus Rascht/Iran

Gießen, im Juli 1973



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. E. Menden

Prof. Dr. K. Mengel

Prof. Dr. E. Küster

11. August 1973

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	6
A. Pflanzenanzucht	
1) Anzucht von Ackerbohnen, Rotklee und Luzerne in Wasserkultur	6
2) Anzucht von Ackerbohnen für $^{14}\text{CO}_2$ -Markierungsversuche	11
3) Markierungsversuch mit $^{15}\text{N}_2$ bei Ackerbohnen	11
B. Pflanzenanalyse	
1) Aufarbeitung des Materials für die Bestimmung löslicher Aminosäuren (Papierchromatographie)	13
2) Aufarbeitung der Knöllchen für die ^{14}C -Bestimmung	16
3) Aufarbeitung des Materials für die ^{15}N -Bestimmung der Aminosäure- und Proteinfraktion	16
4) Bestimmung der Protein-N-Fraktion	23
5) Kaliumbestimmung im Pflanzenmaterial	23
III. Ergebnisse	
A. Erträge und K-Gehalte der untersuchten Pflanzen in Abhängigkeit von der K-Düngung	23
B. Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt an löslichen Aminosäuren bei:	31
1) Ackerbohnen	31
2) Rotklee	37
3) Luzerne	40
4) Knöllchen von Rotklee und Luzerne	45
5) Ackerbohnen-Versuch ^{15}N (Gesamt lösliche N-Fraktion)	47
C. Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung auf den Gehalt an Protein-N	50

D. Verteilung von markiertem ^{14}C in der Zucker- und Aminosäurefraktion in Abhängigkeit von der K-Düngung	58
E. Die Gehalte an ^{15}N -markierten Aminosäuren und Protein-N in Abhängigkeit von der K-Düngung	60
IV. Biochemie der mikrobiologischen N_2 -Fixierung	68
V. Diskussion	84
VI. Zusammenfassung	95
VII. Literatur	97

I. Einleitung

Die Aufgabe der Pflanzenernährung und Biochemie der Pflanze besteht darin, Ertrag und Qualität der pflanzlichen Erzeugnisse zu steigern und ihre Synthesewege zu erforschen. Wie schon bekannt ist, werden die Ertragsbildung und die Qualitätsänderung von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst. Während die exogenen Faktoren wie Klima-Boden-Nährstoffe usw. zum großen Teil regulierbar und veränderlich sein können, sind die endogenen Faktoren weitgehend genetisch festgelegt. Durch Veränderung der äußeren Faktoren kann man die biochemischen Synthesen beschleunigen oder verlangsamen und sogar verhindern. Diese Gesetzmäßigkeiten gelten für alle unsere Kultur-, Zier- und Wildpflanzen. Auch die Leguminosen mit ihren stickstofffixierenden Knöllchenbakterien sind davon betroffen. Die Knöllchenbakterien sind fähig, eine beträchtliche Menge an Luftstickstoff zu assimilieren, sodaß ihre Wirtspflanzen vom Düngerstickstoff weitgehend unabhängig sind.

Unter natürlichen Bedingungen werden bei Luzerne bis 389 kg/ha, bei Klee bis 222 kg/ha und bei Erbsen bis 156 kg/ha Stickstoff fixiert, (SEEGER 1961; SPECTOR 1956).

Die Problematik der biochemischen Wege der Stickstoff-Fixierung wird seit längerer Zeit zu klären versucht. Erst neuerdings gelang es durch Anwendung von Isotopen

und durch fortschreitende Entwicklung und Verfeinerung der Analysetechnik die Assimilation von molekularem Stickstoff durch freilebende oder in Symbiose mit höheren Pflanzen lebende Mikroorganismen etwas zu erhellen.

Der Prozeß der Stickstoff-Fixierung wird durch eine Reihe Faktoren beeinflusst. Obwohl die Knöllchenbakterien zur N_2 -Fixierung eine optimale Menge an Sauerstoff benötigen (BERGERSEN 1962; BURRIS, MAGEE, BACH 1965) wirkt dieser in höheren Konzentrationen auf die N_2 -Bindung hemmend (BERGERSEN 1962).

Neben molekularem Wasserstoff (WILSON 1940; HOCH, SCHNEIDER, BURRIS 1960) behindern die Fungizide (MILTHORPE 1945; RUHLOFF u. BURTON 1951) und Bodeninsektizide (BRAITHWAITE et al. 1958) den Prozeß der Stickstoffbindung und die Knöllchenentwicklung. Interessanterweise haben Herbizide selbst bei Konzentrationen, bei denen sie auf die höheren Pflanzen toxisch wirken, keinen negativen Einfluß auf die Knöllchenbildung (CARLYLE u. THROPE 1947; FLETCHER 1956; FLETCHER et al. 1957, 1956).

Zur optimalen Stickstoffbindung benötigen die Pflanzen Licht (VIRTANEN, MOISIO u. BURRIS 1955; BERGERSEN 1970) und eine gewisse CO_2 -Konzentration (McKEE 1962- van SCHREVEN 1958a, 1959 u. WILSON 1940).

Auch die Temperatur spielt hierbei eine große Rolle. So zeigen die einzelnen Pflanzen bzw. Rhizobienstämme bei verschiedenen Temperaturen ihre Höchstleistung; PATE (1961 - 1962) fand bei Untersuchungen an *Vicia atropurpurea* und *Medicago tribuloides* die maximale N_2 -Fixierung bei einer Temperatur von $24^{\circ}C$.

Nach mehreren Autoren hemmt eine Stickstoff-Düngung die Knöllchenbildung die N_2 -Fixierung (van SCHREVEN 1958a, 1959, ALLISON, LUDWIG 1939; ALLOS, BARTHOLOMEW 1955, 1959; BÜRGIN-

WOLFF 1959; DIENER 1950; LJUNGGREN, FÄHRAEUS 1961; VIRTANEN 1952; VIRTANEN, ERKAMA, LINKOLA 1947), wobei die Nitraternährung sich stärker auswirkte als die Ammoniumernährung (RICHARDSON et al. 1957). RAGGIO u. RAGGIO (1962) hingegen berichten, daß mineralische Stickstoff-Dünger die N_2 -Fixierung nicht behindern, außer in höheren Konzentrationen. Immerhin benötigen die Pflanzen im ersten Wachstumsstadium eine niedrige Konzentration an mineralischem Stickstoff, so lange bis die Knöllchen gebildet sind (GIBSON u. NUTMAN 1960; MACCONNELL u. BOND 1957b).

Es hat sich gezeigt, daß geimpfte Leguminosenpflanzen eine erhöhte Menge Molybdän benötigen (ANDERSON u. THOMAS 1946; ANDERSON 1956a u. b, HEWITT 1958; JENSEN u. BETTY 1943), welches während der N_2 -Fixierung vermehrt aufgenommen wird. Ebenso wurde ein erhöhter Bedarf an Ca festgestellt. Weiterhin ist bekannt, daß sich die Knöllchenbakterien im neutralen bis schwach saueren Bereich am besten entwickeln. Van SCHREVEN (1958a) vermutet sogar einen Zusammenhang zwischen Molybdän-Bedarf und pH-Wert, da die Molybdän-Verfügbarkeit pH-abhängig ist (SCHEFFER u. SCHACHTSCHABEL).

Der erhöhte Bedarf an Phosphor kann mit dem höheren Verbrauch an ATP bei der Stickstoffbindung erklärt werden. Über eine positive Wirkung des Phosphors auf das Knöllchengewicht und die damit zusammenhängende N_2 -Fixierung berichten POSCHENRIEDER u. LESCH (1943).

Nur wenige Daten liegen über den Einfluß des Kaliums auf die N_2 -Fixierung vor. POSCHENRIEDER u. LESCH (1943) schreiben, daß durch Kaliumsteigerung die Knöllchenzahl

erhöht wird. ROBERT u. OLSEN (1942) beobachteten, daß sich die stimulierende Wirkung des Phosphors auf die N_2 -Fixierung nur bei Mitwirkung des Kaliums zeigt. ANDERSON u. SPENCER (1948) schreiben andererseits, daß das Kalium nur dann auf die Knöllchenbildung stimulierend wirkt, wenn Phosphor vorhanden ist. Diese Versuche wurden unter extremen Bedingungen durchgeführt.

Aus zahlreichen Beobachtungen und auch Experimenten geht hervor, daß eine reichliche PK-Düngung zu Grünland den Anteil an Leguminosen erhöht (BRAUER 1960). Tabelle 1 zeigt ein typisches Ergebnis dieser Art.

Tabelle 1: Botanische Zusammensetzung eines Wiesen-
bestandes in Abhängigkeit von der Düngung
(n. A. BRAUER)

Düngung	Gräser %	Leguminosen %	Kräuter %
ungedüngt	67	6	27
ohne Kali	67	7	26
ohne Phosphat	59	9	32
PK-Düngung	63	21	16
NPK-Düngung	77	8	15

Leider läßt sich aus derartigen Untersuchungen in den meisten Fällen nicht schließen, ob die günstige Wirkung auf das Leguminosenwachstum mehr auf das Kalium oder den Phosphor oder auch auf die kombinierte Wirkung beider Nährelemente zurückzuführen ist. Weiterhin ist nicht bekannt, ob das Kalium nur

über die Wirtspflanze mehr indirekt wirkt, oder ob es sich direkt auf die Rate der N_2 -Assimilation auswirkt. Diese Frage soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Es soll also experimentell überprüft werden, ob eine gut mit Kalium ernährte Leguminosenpflanze absolut und relativ mehr molekularen Stickstoff mittels ihrer Knöllchenbakterien (*Rhizobium*) assimiliert.

" Absolut " bedeutet hierbei die assimilierte Stickstoffmenge bezogen auf die Gesamtpflanze. " Relativ " bedeutet die Stickstoffmenge, die je Gewichtseinheit Pflanzensubstanz assimiliert wurde. Für die Versuche wurden die Leguminosenarten Ackerbohnen, Rotklee und Luzerne verwendet. Die Pflanzen wurden in Wasserkultur angezogen, da bei dieser Art der Kultivierung die Ernährungsbedingungen gut reguliert werden können.

II. Methodik

A. Pflanzenanzucht

1) Anzucht von Ackerbohnen (*Vicia faba*), Rotklee (*Trifolium pratense*) und Luzerne (*Medicago sativa*) in Wasserkultur

Der Pflanzensamen wurde eine Woche lang unter feuchtem Fließpapier auf einem Netz vorgekeimt. Die jungen Pflanzen wurden mit arteigenen Bakterien, die vorher aus Boden isoliert und auf Agar in Reinkultur vermehrt wurden, geimpft und in Wasserkultur mit drei Kalistufen zu je vier Wiederholungen angezogen. Jedes Versuchsglied bestand bei Ackerbohnen (*Vicia faba*) im ersten Versuch aus 6, im zweiten Versuch aus 5 Pflanzen, bei Rotklee (*Trifolium pratense*) in jedem Versuch aus 50 Pflanzen und bei Luzerne (*Medicago sativa*) aus 40 Pflanzen pro Gefäß.

Der Wasserkultur lag eine Nährlösung folgender Zusammensetzung zugrunde (mmol bzw. mval/l)

Tabelle 2:

<u>Makronährstoffe</u>			<u>Mikronährstoffe</u>			
MgSO ₄	3	mmolar	MnSO ₄	28	mmolar x 10 ⁻³	
NaH ₂ PO ₄	1,5	"	H ₃ BO ₃	20	"	" "
CaCl ₂	6	"	CuSO ₄	2,8	"	" "
			ZnSO ₄	2,8	"	" "
			Na-Molybdat	0,6	"	" "
			CoCl ₂	0,6	"	" "
			Fe-Chelat	20	"	" "

Die drei K-Stufen hatten folgende Konzentrationen:

K_1	0,5	mval	K/l	als	K_2SO_4
K_2	1,5	mval	K/l	als	K_2SO_4
K_3	4,5	mval	K/l	als	K_2SO_4

Die K-Konzentration in der Nährlösung wurde alle 2 Tage kontrolliert und die Nährlösung aller Varianten dann erneuert, wenn die K-Konzentration in der K_1 -Variante auf nahezu Null abgesunken war. Gleichzeitig wurden die Pflanzen neu geimpft.

In der ersten Woche erhielten die Pflanzen zusätzlich 1 mmol NH_4NO_3 (1 mmol/l Nährlösung) als Startstickstoff, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Knöllchen ausgebildet waren. Der pH-Wert der Nährlösung wurde auf pH 6 eingestellt, da dieser den optimalen Lebensbedingungen der Leguminosen und der Knöllchenbakterien entspricht.

Täglich wurde die Nährlösung mit Natronlauge erneut auf pH 6 eingestellt. In den ersten Tagen sank der pH-Wert der Nährlösung von pH 6 auf pH 3,5 bis 4 ab, da der NH_4 -Stickstoff mit höherer Rate assimiliert wurde als der NO_3^- -Stickstoff, wie die Stickstoffanalyse der Nährlösung ergab (Tabelle 3). Dieser interessante Befund besagt, daß die Leguminosen im Gegensatz zu den Nichtleguminosen zumindest in der Anfangsentwicklung Ammonium-N gegenüber Nitrat-N bevorzugen.

Tabelle 3:

Gehalte an Ammonium- und Nitratstickstoff
in der Nährlösung nach 5 Tagen bei Acker-
bohnen (Versuch I)

	<u>NH₄ - N</u> <u>mg/Gefäß</u>	<u>NO₃ - N</u> <u>mg/Gefäß</u>
verabreicht	70	70
gefunden	K ₁ 0	21
	K ₂ 0	12,6
	K ₃ 0	0

MARTIN kam bei Untersuchungen an Buschbohnen zu einem ähnlichen Ergebnis (MARTIN 1970). Außerdem wurde der NO₃-N bei der höheren K-Gabe besser von den Pflanzen aufgenommen als bei niedriger K-Gabe. Die Nährlösung wurde am Anfang ständig und später dreimal täglich eine halbe Stunde lang belüftet.

Die Ernte erfolgte zum Blühbeginn der Pflanzen etwa nach 35 Tagen Anzucht in der Wasserkultur. Bei Rotklee und Luzerne, nachdem die Pflanzen wieder gut und gleichmäßig nachgewachsen waren, fand eine zweite Ernte ebenfalls im gleichen Stadium (Blühbeginn) statt. Hierbei wurde sowohl das oberirdische Pflanzenmaterial als auch die Wurzel geerntet und analysiert.

Alle Versuchspflanzen zeigten gutes und gleichmäßiges Wachstum, keinerlei Mangelsymptome und in allen Varianten eine optimale Knöllchenbildung, wie aus Abb. 1, 2 und 3 deutlich zu ersehen ist.

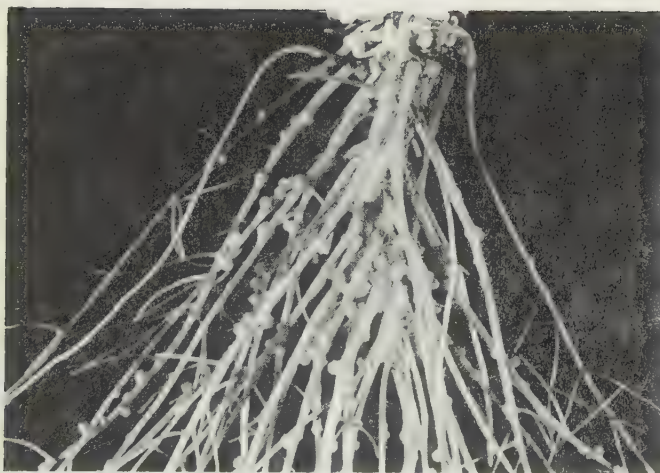


Abb. 1 Wurzelknöllchen bei der Ackerbohne
(*Vicia - faba*)



Abb. 2 Wurzelknöllchen bei dem Rotklee
(*Trifolium pratense*)

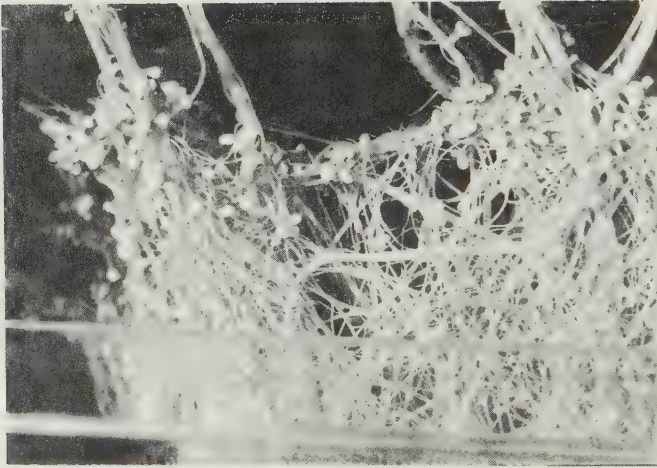


Abb. 3 Wurzelknöllchen bei der Luzerne
(*Medicago sativa*)

2) Anzucht von Ackerbohnen zur Bestimmung von $^{14}\text{CO}_2$ -
markierten Aminosäuren und Zuckern

Für weitere Untersuchungen physiologischer Vorgänge wurden Ackerbohnen (*Vicia faba*) drei Wochen lang wie oben beschrieben in Nährlösung kultiviert. Zu dieser Zeit hatten sich auch hier an den Wurzeln wieder ausreichend Knöllchen gebildet. Unter kontrollierten Bedingungen wurden die Pflanzen in einer Plexiglasbox mit 1 mCi $^{14}\text{CO}_2$ für 22 Stunden begast. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet, und die Knöllchen wurden für die Untersuchung der markierten löslichen Aminosäuren- und Zuckerfraktionen von den Wurzeln abgetrennt. Der Begasungsversuch wurde einmal mit 2-K-Stufen und in Wiederholung mit 3-K-Stufen durchgeführt (Tabelle 2).

3) Markierungsversuch mit stabil markiertem Stickstoffgas
($^{15}\text{N}_2$) bei Ackerbohnen

Zur Untersuchung der N_2 -Assimilation bei Leguminosen wurden Ackerbohnen (*Vicia faba*) in einem eigens dafür gefertigten Kasten (Wurzelbox, Abb. 4) mit markiertem $^{15}\text{N}_2$ 12 Stunden lang begast. Die Versuchsanstellung bestand im ersten Versuch aus 2, im zweiten Versuch aus 3 Kalivarianten zu je 10 Pflanzen. Jeweils 5 Pflanzen einer Variante wurden zur Untersuchung zusammengefaßt.

Die Wurzelbox selbst war durch drei Querwände unterteilt (Abb. 4). In der Frontplatte des Mittelfaches befanden sich zwei Öffnungen mit abgedichtet eingesetzten Handschuhen, um in dem Kasten hantieren zu können ohne die Innenatmosphäre durch Außenluft zu beeinflussen. Der Deckel hatte kleine Bohrungen zum Einsetzen der Pflanzen.



Abb. 4 Die Wurzelbox zur Begasung der Knöllchen mit $^{15}\text{N}_2$ -Gas

Zur Begasung mit $^{15}\text{N}_2$ -Gas wurden die acht Tage alten Pflänzchen in den beschriebenen Kasten (Abb.4), der mit Nährlösung der gleichen Zusammensetzung wie in den vorher genannten Versuchen gefüllt war, eingesetzt und beimpft. Nachdem sich die Pflanzen und die Wurzelknöllchen gut entwickelt hatten, wurde aus dem Kasten $1/4$ der Nährlösung abgelassen. Ein Teil der Wurzeln mit der Hauptmasse der Knöllchen (siehe Abb.1) befand sich nun über der Nährlösung, um optimal das angebotene ^{15}N -Gas assimilieren zu können. Im Mittelfach der Box befand sich die ^{15}N -Gasflasche (1 l $^{15}\text{N}_2$ -Gas mit 93 Atom % Anreicherung). Alle Öffnungen des Kastens und die Bohrungen, durch die die Pflanzen eingesetzt worden waren, wurden mit einer Knetmasse (Prestit) sehr gut abdichtet, um jeglichen Gasaustritt zu verhindern. Die Gasflasche wurde zertrümmert, so daß ^{15}N -Gas ausströmte. Mittels einer Pumpe wurde das Gas gleichmäßig im Wurzelraum verteilt.

Die Menge an ^{15}N -Gas war so berechnet, daß in dieser Atmosphäre 5 Atom % $^{15}\text{N}_2$ beim ersten Versuch und 4 Atom % $^{15}\text{N}_2$ beim zweiten Versuch der Gesamt N_2 -Menge vorlag.

B. Pflanzenanalyse =====

1) Aufarbeitung des Pflanzenmaterials für die Bestimmung löslicher Aminosäuren (Papierchromatographie).

Klee und Luzerne wurden gleich nach der Ernte in Sproß und Wurzel, die Ackerbohnen in Blatt, Stengel und Wurzel getrennt. Die zerkleinerte und ausgewogene Pflanzenmasse wurde sofort mit 75%igem Äthanol zur Abtötung der Pflanzenzellen übergossen und 24 Stunden extrahiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, die letzte Extraktion wurde mit heißem Alkohol vorgenommen. Die vereinten Extrakte wurden im Vakuum-

rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockene eingengt, anschließend mit einem Chloroform- Wassergemisch (1:1 v) aufgenommen. Von der wässrigen Phase wurde zur Abtrennung der Aminosäuren ein aliquoter Teil auf einen Kationenaustauscher (Dowex 50 WX 4 mesh 100-200), der mit H⁺-Ionen beladen war, aufgebracht. Die effluierenden Zucker und Anionen wurden verworfen. Die als Kationen gebundenen Aminosäuren wurden anschließend mit 2 n NH₄ OH eluiert, bei 55°C bis zur Trockene eingengt, danach mit einer bestimmten Wassermenge wieder aufgenommen und ein aliquoter Teil davon auf Whatman-Nr. 1 Papier aufgetragen und zweidimensional chromatographiert.

Das Fließmittel für die erste Laufrichtung bestand aus wassergesättigtem Phenol, (ph 5,6), für die zweite Laufrichtung aus Butanol-Eisessig und Wasser, im Verhältnis 8 : 1 : 4 v : v . Die Laufzeit betrug in gleichmäßig temperierten Kammern (22°C) für das erste Laufgemisch 24 Stunden und 42 Stunden für die zweite Laufrichtung. Das Chromatogramm wurde mit einer Mischung von Ninhydrinlutidin-Colodin besprüht und zur Farbentwicklung eine halbe Stunde lang bei 60°C getrocknet. Die einzelnen isolierten Aminosäureflecken wurden ausgeschnitten und zwei Stunden lang mit 50%igem Äthanol eluiert und anschließend photometriert (MENGEL u.HELAL 1968, HEILENZ et al.).

Bei den methodischen Untersuchungen zur Aminosäurebestimmung stellte sich heraus, daß es bei dem Material der Ackerbohnen und bei den Wurzeln von Rotklee notwendig war, die Extrakte anzusäuern und zu zentrifugieren. Erst durch Ansäuern mit 1 n HCl (2 ml HCl/20 ml Probe) und Zentrifugieren wurden die Aminosäuren vom Austauscher sorbiert. Wahrscheinlich lagen in den nicht angesäuerten

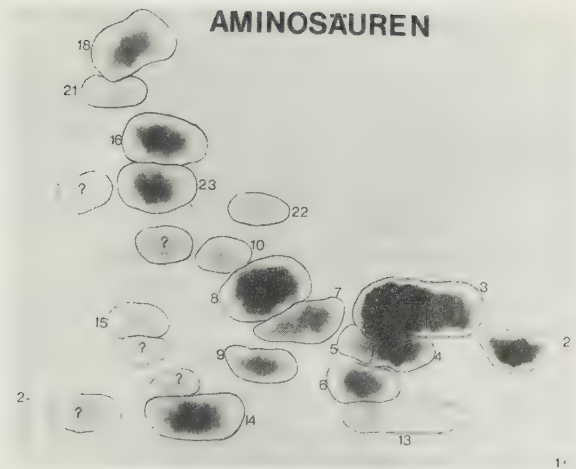
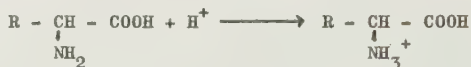


Abb. 5 Zweidimensionales Aminosäuren Papierchromatogramm

- 2 = Asparaginsäure
- 3 = Glutaminsäure
- 4 = Serin
- 5 = Glyzin
- 6 = Asparagin
- 7 = Threonin
- 8 = Alanin
- 9 = Glutamin
- 10 = β -Alanin
- 13 = Arginin
- 14 = Methioninsulfoxyd
- 15 = Prolin
- 16 = Valin
- 18 = Leuzin
- 21 = Phenylalanin
- 22 = Tyrosin
- 23 = γ - Aminobuttersäure

Proben die Aminosäuren noch nicht als Kationen vor.



Bei dem Material der Luzerne war diese Behandlung nicht nötig. Hier gab es bei angesäuerten und nicht angesäuerten Proben keine quantitativen und qualitativen Unterschiede. Dieser Befund legt dar, daß im Einzelfall immer überprüft werden muß, ob eine quantitative Bindung der Aminosäuren im Austausch gegeben ist.

Abb. 5 zeigt ein typisches zweidimensionales Aminosäurechromatogramm.

2) Aufarbeitung der Knöllchen für die ^{14}C -Bestimmung in der Zucker- und Aminosäurefraktion

Nach der Begasung mit markiertem CO_2 wurden die Pflanzen geerntet, die Knöllchen von den Wurzeln abgetrennt und dreimal mit 75%igem Äthanol extrahiert. Die Trennung der Aminosäuren erfolgte in einem Kationenaustauscher wie oben beschrieben. Das Eluat des Kationenaustauschers tropfte direkt auf eine Anionenaustauschersäule. Der Anionenaustauscher bindet die organischen Säuren, während die Zucker durchlaufen. Von den so getrennten Zuckern und Aminosäuren wurde jeweils ein aliquoter Teil in Aquasol (NEN) aufgenommen und im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler gemessen.

3) Aufarbeitung des Pflanzenmaterials für die ^{15}N -Bestimmung der Aminosäure- und Proteinfraktion

Nach der Behandlung mit markiertem N_2 wurden die Pflanzen in Blatt, Stengel, Wurzel und Knöllchen aufgeteilt, gewogen

und ebenfalls sofort, wie oben beschrieben, extrahiert. Aus der wässrigen Phase wurde der Amino-N und aus dem Extraktionsrückstand der Protein-N (Rest-N) nach Kjeldahl bestimmt. Das nach der Titration vorliegende Ammoniumchlorid wurde bis zur Trockne eingengt. Das kristallisierte Ammoniumchlorid ist in diesem Zustand lagerfähig. Zur Durchführung der Analyse wird dieses quantitativ bestimmte Ammoniumchlorid in dest. Wasser so gelöst, daß sich in 0,1 ml $15 \mu\text{g}$ N befinden.

Alkalisches Natriumhypobromit (NaOBr), das für die Freisetzung molekularen Stickstoffes unter Vakuum verwendet wird (RITTENBERG 1948 u. FAUST 1965), stellt man folgendermaßen her:

200 g NaOH werden in 300 ml dest. Wasser unter Kühlen mit Eis gelöst. Zur ersten Hälfte dieser Lösung tropft man im Verlauf von 10 Min. unter gutem Rühren 60 ml Brom p.a. zu. Anschließend fügt man unter Rühren die restliche Hälfte der Natronlauge hinzu. Die fertige Hypobromit-Lösung muß im Kühlschrank aufbewahrt werden, da sonst die Oxydationswirkung nachläßt, und mit gealterten Lösungen keine quantitative Umsetzung mehr stattfindet. Zum Gebrauch verdünnt man die NaOBr -Lösung (1:1 v) mit dest. Wasser.

0,1 ml Ammoniumchlorid-Lösung wird mit einer kleinen Pipette in einen Schenkel des Reaktionsgefäßes (Abb. 6, 1) gebracht.

Der zweite Schenkel wird mit 0,2 ml verdünnter alkalischer Natriumhypobromitlösung beschickt. Nach dem Anbringen des Entladeröhrchens (Abb. 6, 2) mittels Picein, sowie des Reaktionsgefäßes an die Oxydationsapparatur (Abb. 6) werden die beiden Lösungen im Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff ausgefroren. Sodann wird evakuiert, unter verbleibenden Vakuum die Lösung im Reaktionskölbchen wieder aufgetaut und dieser

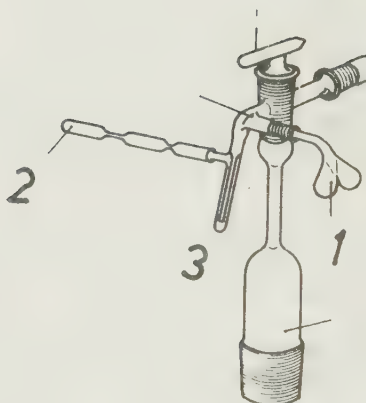


Abb. 6 Oxydationsapparatur zur Herstellung von N_2 -Gasproben für die optische ^{15}N -Isotopenanalyse
1 = Reaktionsgefäß; 2 = Entladeröhrchen; 3 = Kühlfinger

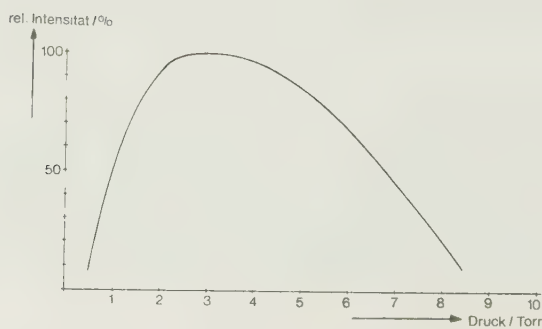


Abb. 7 Die Intensität der Emission in Abhängigkeit vom Druck im Entladeröhrchen (FAUST 1965)

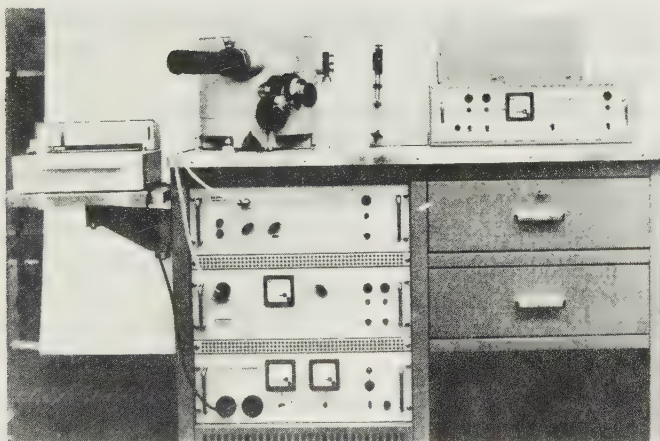
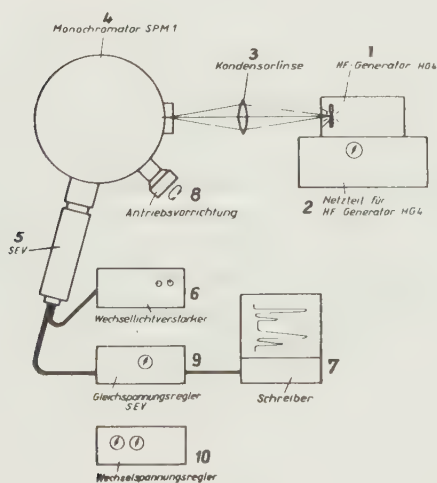


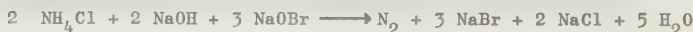
Abb. 8a ^{15}N - Analysator (NO I - 4)



Meßprinzip

Abb. 8 Meßprinzip des ^{15}N -Analysators (NO I - 4)

Vorgang noch zweimal wiederholt, um die Restluft vollständig aus dem System zu entfernen. Während des letzten Evakuierens wird mit der Spitzflamme gleichzeitig das Entladeröhrchen ausgeheizt. Nach dem letzten Auftauen und anschließendem Vermischen der beiden Lösungen erfolgt die Entwicklung des molekularen Stickstoffs. Vor dem Abschmelzen des Entladeröhrchens friert man das im Reaktionsgefäß entstandene Wasser sowie die letzten Wasserdampfreste in dem kleinen Kühlfinger (Abb. 6, 3) mittels flüssigen Stickstoffs aus. Die nach der Oxydation entstehende N₂-Gasmenge



muß einen Druck von 2 - 4 Torr im Entladeröhrchen ergeben, da nur unter diesen Bedingungen, wie Abb. 7 zeigt, eine optimale Messung und Auswertung der Probe möglich ist.

Das Stickstoffgas in dem Entladeröhrchen besteht aus ¹⁵N₂, ¹⁵N¹⁴N und ¹⁴N₂. Die prozentuale Menge an ¹⁵N₂ wird mittels eines ¹⁵N-Analysators (NOI 4 der Firma Statron, Fürstenwalde) gemessen (Abb. 8 a). Der Meßvorgang läuft wie folgt:

Das Entladeröhrchen wird in einem Hochfrequenz-Generator (Abb. 8 1,2) angeregt und somit zum Leuchten gebracht.

Das austretende Licht wird von einer Sammellinse (Abb. 8, 3)

gebündelt und auf den Eintrittsspalt eines Monochromators

(Abb. 8, 4) geleitet. In diesem Monochromator sitzt ein NaCl-

Prisma, das über eine Antriebsautomatik (Abb. 8, 8) um bestimmte

Winkelbeträge gedreht werden kann. Das von diesem Prisma spektral

zerlegte Licht fällt über den Austrittsspalt des Monochromators

auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (Abb. 8, 5), der die

Lichtsignale in elektrische Signale umwandelt und über Verstärker (Abb. 8, 6) und Gleichspannungsregler (Abb. 8, 9) einem Schreiber (Abb. 8, 7) zuführt.

Man macht sich bei der Messung des Spektrums des Stickstoffes zu Nutze, das zwischen 2900 und 4000 Å liegt (Abb. 9). Von diesem Spektrum wird die 2-0 Bande herausgegriffen und durch besondere Verstärker vergrößert und zusätzlich gespreizt d.h. auseinandergezogen, damit die Peaks sich nicht überlagern. Der Schreiber registriert nacheinander die Peaks der Moleküle $^{15}\text{N}_2$, $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ und $^{14}\text{N}_2$ (Abb. 10). Eine Messung dauert 1 Min. und wird viermal wiederholt, um einen repräsentativen Mittelwert zu erhalten.

Die Peakhöhen dienen der Berechnung (Abb. 10). Die Peakhöhen c und a, d.h. die Intensität der Bandenköpfe, werden in mm abgelesen und auf den gleichen Verstärkungsgrad V bezogen. Aus ihrem Verhältnis läßt sich nach

$$C = \frac{100}{2R + 1} \quad (\text{Atom \% } ^{15}\text{N})$$

und
$$R = \frac{a \cdot Vc}{c \cdot Va}$$

die scheinbare Häufigkeit des Isotops ^{15}N in Atom % angeben. Diese wird dann mit Hilfe einer Eichkurve korrigiert, die sich durch Messung von Standardproben aufstellen läßt. Da die natürliche relative Häufigkeit des stabilen ^{15}N -Isotops in der Natur 0,37 Atom % beträgt, wurden von allen ^{15}N -Werten dieser Arbeit 0,37 % abgezogen. Die Einzelheiten der Technik und Analytik wurden von MEIER (1960), HOCH u. WEISSER (1950), FAUST (1960, 1965, 1969), MEIER u. MÜLLER (1965) beschrieben.

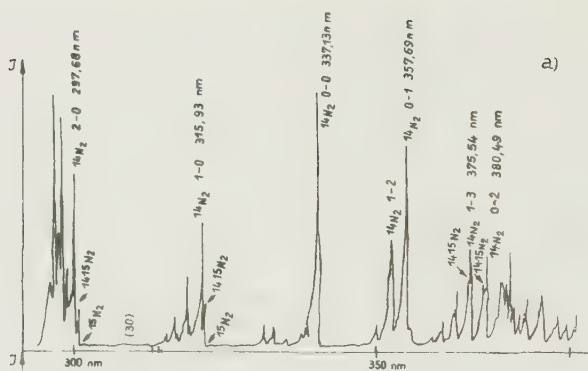


Abb. 9 Stickstoffspektrum zw. 2900 - 4000 Å

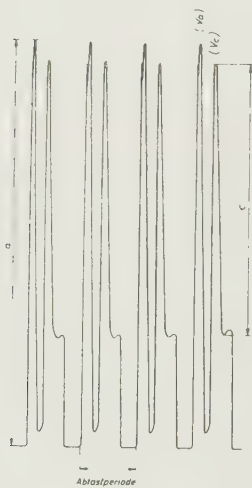


Abb. 10 Kurvenbild einer Messprobe in vierfacher Wiederholung

4) Bestimmung der Protein-N-Fraktion

Aus dem Rückstand des Pflanzenmaterials nach Alkohol-extraktion wurde nach dem Kjeldahlverfahren der Protein-Stickstoff (Rest-N) bestimmt.

5) Kaliumbestimmung im Pflanzenmaterial

Das Ausgangsmaterial für die K-Bestimmung stellten die bei 105°C getrockneten Pflanzenproben dar. Die Trockensubstanz wurde im Muffelofen bei 450°C verascht und der Rückstand mit verdünnter HNO_3 ($\text{H}_2\text{O} : \text{HNO}_3$ 2 : 1 v) aufgenommen, verdünnt und in salzsaurer Lösung mit dem Atom-Absorptions-Spektralphotometer (Perkin-Elmer 303) gemessen.

III. Ergebnisse

A. Erträge und K-Gehalte in Abhängigkeit von der K-Düngung =====

Entwicklung und Wachstum der Pflanzen verliefen normal. Die gesteigerte Kalium-Ernährung machte sich in den ersten zwei Wochen des Wachstums in der Wuchshöhe nicht bemerkbar. Später konnte visuell deutlich erkannt werden, daß die Pflanzen mit der Ernährungsstufe K_3 kräftiger ausgebildet waren als die Pflanzen der K_2 -, bzw. K_1 - Stufe. An den Versuchspflanzen konnten keine Mangelsymptome festgestellt werden.

Tabelle 4 zeigt die produzierte Pflanzenmasse bei Ackerbohnenversuch I.

Tabelle 4

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf Ertrag und Knöllchenbildung bei Ackerbohnen
 (g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 4 Gefäßen)

Versuch I

	Blatt	Stengel	Wurzel	Gesamtertrag	Knöllchenanzahl
K ₁	67,6	60,2	125,2	253,0	2700
K ₂	73,9	64,9	127,6	267,4	3715
K ₃	77,5	69,7	126,0	273,2	2665

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, wurde der Ertrag der oberirdischen Pflanzenmasse durch die gesteigerte K-Ernährung erhöht. Auf die Ausbildung der Wurzelmasse hatte die unterschiedliche K-Ernährung keinen deutlichen Einfluß. Der Anstieg der Erträge entsprach nicht den Proportionen der K-Konzentrationen der Nährlösung (Tabelle 2). Der K-Gehalt der Pflanzen mit der niedrigsten K-Stufe lag bereits ziemlich hoch (siehe Tabelle 5). Dieser hohe K-Gehalt der Variante K₁ mit 3,0% K/TS erklärt sich damit, daß die Pflanzen während ihrer Vegetationsperiode im Frühjahr (April-Juni) sehr wechselnder Witterung ausgesetzt waren. Durch regelmässige Kontrolle der Nährlösung konnte festgestellt werden, daß die Pflanzen bei kühler werdenden Temperaturen beachtliche Mengen an Kalium in die Nährlösung abgaben (MENGEL 1965; MENGEL 1964; MARSCHNER u. SCHAFARCZYK 1967). Die Kaliumabgabe der K₃-Pflanzen an die Nährlösung war deutlich höher als die der K₂-Pflanzen. Bei den K₁-Pflanzen war während der genannten Vegetationsperiode keine K-Abgabe festzustellen.

Tabelle 5 Einfluß der gesteigerten K-Düngung auf den
Kaliumgehalt der oberirdischen Pflanzenteile
bei den einzelnen Versuchspflanzen

(Angaben in % K i.d. TS)

			K ₁	K ₂	K ₃
Ackerbohnen	Versuch	I	3,0	4,4	4,5
	Versuch	II	2,2	3,0	3,3
Rotklee	I. Schnitt		2,0	2,8	3,4
	II. Schnitt		2,5	3,7	4,6
Luzerne	I. Schnitt		2,7	3,4	3,7
	II. Schnitt		2,2	2,9	3,6
Ackerbohnen 15 _N -Versuch	Versuch	I	3,7	---	3,8
	Versuch	II	1,0	2,2	3,6

In einem Parallelversuch, der unter ausgeglicheneren Temperaturen durchgeführt wurde (Juli-August), war der positive Einfluß des Kaliums auf den Ertrag besser zu erkennen (Tabelle 6).

Tabelle 6 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf den Ertrag und die Knöllchenbildung
bei Ackerbohnen

(g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 4 Gefäßen)

Versuch II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Gesamtertrag	Knöllchenzahl
K ₁	73,6	56,6	109,2	239,4	1355
K ₂	85,0	65,6	125,5	276,1	1400
K ₃	93,4	66,0	136,0	295,4	1592

Der Kaliumgehalt der oberirdischen Pflanzenteile bei diesem Versuch nahm von K₁ nach K₃ kontinuierlich zu (Tabelle 5). Diese K-Steigerung machte sich bei der Ertragsbildung deutlich bemerkbar. Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, nahmen die Erträge aller Pflanzenteile, wie Blatt, Stengel und Wurzel von K₁ nach K₃ zu. Außerdem wurde die Anzahl der Knöllchen positiv beeinflusst. Bei Rotklee und Luzerne wurden ebenfalls durch eine steigende Kalium-Düngung höhere Erträge erzielt (Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7 Der Einfluß einer steigenden Kaliumgabe
auf den Ertrag bei Rotklee
 (g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 4 Gefäßen)

	I. Schnitt	II. Schnitt	Wurzel	Gesamtertrag
K ₁	156,6	229,6	199,4	585,6
K ₂	195,9	274,2	187,6	657,7
K ₃	199,4	269,5	195,6	664,5

Tabelle 8 Der Einfluß einer steigenden Kaliumernährung
auf den Ertrag bei Luzerne
 (g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 4 Gefäßen)

	I. Schnitt	II. Schnitt	Wurzel	Gesamtertrag
K ₁	68,2	180,1	203,2	451,5
K ₂	67,1	193,4	205,6	466,1
K ₃	87,9	188,0	218,0	493,9

Die Wurzelmasse wurde bei diesen Versuchen ebenfalls durch die gesteigerten Kaliumgaben wenig beeinflusst. Die Sproßerträge von Rotklee steigen bei beiden Schnitten von K₁ nach K₃ an (Tabelle 7). Bei Luzerne konnte keine eindeutige K-Wirkung auf den Ertrag im zweiten Schnitt festgestellt werden (Tabelle 8).

Die produzierte Pflanzenmasse zur Zeit des zweiten Schnittes lag bei beiden Pflanzen beachtlich höher als die des ersten Schnittes. Dies ist auf eine verbesserte N_2 -Fixierung der Knöllchenbakterien zurückzuführen, da zu dieser Zeit die Knöllchenbildung am besten entwickelt war.

Die Kaliumgehalte der oberirdischen Pflanzenteile wurden bei beiden Versuchen und beiden Schnitten deutlich positiv beeinflusst (Tabelle 5). Sie nahmen kontinuierlich zu.

Auch die beiden Ackerbohnenversuche, die für die Bestimmung des markierten Stickstoffes vorgesehen waren, zeigten eine erhebliche Ertragssteigerung in Abhängigkeit von der Kaliumernährung (Tabelle 9 und 10).

Tabelle 9 Der Einfluß einer gesteigerten K-Versorgung
auf den Ertrag und die Knöllchenbildung bei
Ackerbohnen

(g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 2 Gefäßen)

Versuch ^{15}N I

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöll. Anz.	Knöll. Gew.	Gew.pro Knöll. mg	Gesamt ertrag
K ₁	43,7	36,8	59,2	1488	5,2	3,5	144,9
K ₃	54,8	41,8	73,7	1942	6,8	3,5	177,1

Tabelle 10 Der Einfluß einer gesteigerten K-Versorgung auf
den Ertrag und die Knöllchenbildung bei Ackerbohnen

(g Frischsubstanz/Gefäß, Mittelwerte aus 2 Gefäßen)

Versuch ¹⁵N- II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöll. Anz.	Knöll. Gew.	Gew.pro Knöll.mg	Gesamt- ertrag
K ₁	77,8	66,8	77,6	1165	7,6	6,5	229,8
K ₂	96,8	83,4	106,6	1248	9,0	7,2	295,8
K ₃	109,3	86,5	115,1	1251	10,0	8,0	320,9

Die Pflanzen dieser Versuche wurden unter konstanten Bedingungen in einer Klimakammer angezogen. Die Pflanzen wurden im ersten Versuch nach vier Wochen, im zweiten Versuch nach sechs Wochen Nährlösungskultur jeweils 12 Stunden lang mit ¹⁵N-Gas begast und anschließend geerntet.

Im ersten Versuch, der zwei Kalistufen enthielt, wurde die Nährlösung vor der Begasung erneuert. Der Kaliumbedarf der Pflanzen in der K₁-Variante war größer, und die Pflanzen konnten während der Begasung das Kalium rasch aufnehmen. Vermutlich läßt sich somit der hohe K-Gehalt von 3,7% K in der TS bei der Variante K₁ erklären (Tabelle 5). Diese relativ hohe Kalium-Menge, die wahrscheinlich in den letzten Stunden von den Pflanzen verstärkt aufgenommen werden konnte, kam in so kurzer Zeit weder im Ertrag (Tabelle 9) noch in den Gehalten an Inhaltsstoffen (Tabelle 30-31) zur Wirkung.

Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, wurden die Erträge der einzelnen Pflanzenteile, sowohl Blatt als auch Stengel und Wurzel, ebenso die Knöllchenanzahl und ihr Gewicht, durch diese gesteigerte Kaliumernährung positiv beeinflusst.

In dem zweiten Versuch waren die Kaliumgehalte der einzelnen Varianten stärker unterschieden, wie Tabelle 5 zeigt. Der Ertragszuwachs in diesem Versuch war beachtlich höher als in dem ersten Versuch (Tabelle 10). Dies läßt sich auf eine höhere Stickstoff-Fixierung der Knöllchenbakterien bei besserer Kaliumversorgung zurückführen. Besonders bemerkenswert erscheint das Verhältnis zwischen Knöllchenanzahl und Knöllchengewicht im zweiten ¹⁵N-Versuch. Wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, nahm das Gewicht der einzelnen Knöllchen von K₁ nach K₂, bzw. von K₂ nach K₃ um jeweils 11% und von K₁ nach K₃ sogar um 23% zu.

Dies stimmt nicht mit den Untersuchungsergebnissen von POSCHENRIEDER und LESCH (1945) überein. Sie schrieben, daß durch Kaliumsteigerung nur die Knöllchenanzahl erhöht werde, nicht aber das Gewicht der einzelnen Knöllchen.

B. Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den

=====

Gehalt an löslichen Aminosäuren bei Ackerbohnen

=====

1) Ackerbohnen

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, veränderte die steigende K-Ernährung den Gesamtgehalt an löslichen Aminoverbindungen in den einzelnen Pflanzenteilen.

Durch eine erhöhte Kalium-Düngung stieg der lösliche Aminostickstoff in den Blättern geringfügig an. Noch weniger deutlich war diese Tendenz in den Stengeln (Tabelle 11) zu verzeichnen. Ähnliche Ergebnisse fanden KOCH und MENGEL (1972) bei Rotklee. Auch hier stieg der Gehalt an löslichen Aminosäuren in den oberirdischen Pflanzenteilen mit verbesserter K-Ernährung deutlich an.

Der Gehalt an löslichen Aminosäuren nahm in den Wurzeln, wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, ab. Vermutlich werden die in den Wurzelknöllchen gebildeten Aminosäuren bei besserer Kaliumversorgung schneller in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert (MENGEL und SIMIC 1973). Nicht nur der Gesamtgehalt an löslichen Aminoverbindungen wurde durch die Kalium-Versorgung verändert, sondern auch das Spektrum an einzelnen Aminosäuren.

So stiegen Asparaginsäure, Asparagin und besonders Glutaminsäure in Blatt und Stengel am deutlichsten mit der gesteigerten Kaliumernährung an (Tabelle 11). Glutamin konnte nur in Spuren nachgewiesen werden.

Die Gehalte an Serin, Alanin und γ -Aminobuttersäure waren ziemlich hoch, zeigten aber in Blatt und Stengel kaum eine Reaktion auf die K-Düngung. Phenylalanin und Tyrosin waren

in geringen Mengen nur in Blättern vorhanden. Die übrigen Aminosäuren waren nur in geringen Mengen nachweisbar und wurden in den einzelnen Varianten in Sproß und Stengel nur wenig durch die unterschiedliche K-Ernährung beeinflusst. Betrachtet man die absolute Menge an löslichen Aminosäuren (Tabelle 12), so ist kein eindeutiger K-Einfluß auf die N_2 -Aufnahme und auf die Assimilationsleistung der Knöllchenbakterien festzustellen. Die Gesamtmenge an Aminosäuren ist in den einzelnen Varianten etwa gleich hoch. Der niedrige Gehalt an löslichen Aminoverbindungen in den Wurzeln der K_3 -Variante erklärt sich mit einem erhöhten Transport dieser Aminosäuren in die oberirdischen Pflanzenteile.

Im zweiten Versuch mit Ackerbohnen zeigt sich bei den löslichen Aminosäuren die gleiche Tendenz, sowohl im Gesamtgehalt an Aminoverbindungen als auch im Gehalt an einzelnen löslichen Aminosäuren (Tabelle 13 und 14).

Tabelle 11 Der Einfluß 100 g getrockneten K-Düngung auf den Gehalt
an löslichen Aminosäuren
 (Angaben $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ Frischsubstanz)

A c k e r b o h n e n I

Nr.	Aminosäure	Wurzel			Stengel			Blatt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	54	39	39	32	31	40	46	62	59
3	Glutaminsäure	94	91	73	46	60	70	189	214	257
4	Serin	76	48	31	74	79	69	191	196	220
5	Glycin	9	5	4	7	9	7	7	9	8
6	Asparagin	227	177	172	365	377	384	383	473	511
7	Threonin	21	15	12	27	26	27	37	35	42
8	Alanin	276	149	92	148	163	152	367	320	334
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β -Alanin	Sp.	28	30	19	16	17	34	34	34
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	28	27	24	-	-	-
15	Prolin	Sp.	6	11	17	16	Sp.	88	175	84
16	Valin	20	15	14	22	21	21	35	35	37
18	Leuzin	17	Sp.	18	29	26	24	40	44	43
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	21	36	35
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	56	61	55
23	β -Aminobuttersäure	283	150	124	168	201	214	207	186	184

Sp. = Spuren

1077 723 620 989 1052 1049 1701 1880 1903

Tabelle 12 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an löslichen Aminosäuren
 (Angaben $\mu\text{mol/Ertrag}$)
Ackerbohnen I

Nr.	Aminosäure	Wurzel			Stengel			Blatt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	68	49	48	19	20	28	32	46	45
3	Glutaminsäure	117	115	92	28	39	49	133	158	199
4	Serin	94	61	39	44	51	48	134	145	170
5	Glycin	11	6	5	4	6	5	5	6	7
6	Asparagin	284	225	217	220	245	268	269	348	396
7	Threonin	26	20	15	16	17	19	26	26	33
8	Alanin	346	190	116	89	106	106	257	236	259
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β -Alanin	Sp.	35	37	12	10	11	24	25	26
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	17	18	16	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	62	129	65
16	Valin	25	19	17	13	14	15	25	26	29
18	Leuzin	Sp.	Sp.	Sp.	17	17	17	28	32	34
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	15	27	27
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	39	45	43
23	γ -Aminobuttersäure	354	191	157	101	130	149	145	137	143
		1325	911	743	580	673	731	1169	1386	1476

Tabelle 13

Der Einfluß einer festlegierten K-Düngung auf den Gehalt

an löslichen Aminosäuren

(Angaben $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ Frischsubstanz)Ackerbohnen II

Nr.	Aminosäure	Wurzel			Stengel			Blatt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	37	40	41	38	37	34	52	48	71
3	Glutaminsäure	60	58	61	35	46	39	96	120	126
4	Serin	21	19	19	48	52	47	74	84	83
5	Glycin	3	2	3	9	8	7	10	Sp.	9
6	Asparagin	190	184	158	310	320	280	341	328	400
7	Threonin	9	6	7	17	18	16	15	19	18
8	Alanin	65	61	69	150	159	140	280	281	272
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	34	39	32	Sp.	45	46
10	β -Alanin	17	16	17	20	17	17	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	150	53	99
16	Valin	11	10	13	19	18	19	30	25	25
18	Leucin	14	11	15	25	22	27	36	26	30
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
22	Tyrosin	7	7	6	13	14	15	45	35	41
23	γ -Aminobuttersäure	67	69	88	173	174	174	125	139	118
		501	464	478	891	924	845	1254	1203	1338

Tabelle 14 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an löslichen Aminosäuren
 (Angaben $\mu\text{mol/Ertrag}$)
 A c k e r b o h n e n II

Nr.	Aminosäure	Wurzel			Stengel			Blatt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	40	50	55	21	24	23	39	41	66
3	Glutaminsäure	66	72	83	20	30	26	70	102	118
4	Serin	23	24	25	27	34	31	54	71	78
5	Glycin	3	3	3	5	5	4	7	Sp.	9
6	Asparagin	207	231	215	175	210	185	251	279	373
7	Threonin	10	8	10	10	12	11	11	16	17
8	Alanin	71	77	94	85	104	92	206	239	254
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β -Alanin	19	20	24	11	11	11	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	110	45	92
16	Valin	12	13	17	11	12	13	22	21	23
18	Leucin	15	14	21	14	15	18	26	22	28
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
22	Tyrosin	8	9	8	8	9	9	35	30	38
23	γ -Aminobuttersäure	73	87	120	98	114	115	92	118	110
		547	608	675	485	580	538	921	984	1206

2) Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf den Gehalt an löslichen Aminosäuren
bei Rotklee

Während, wie aus Tabelle 15 zu ersehen ist, der Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren in den Wurzeln gering anstieg, war in den oberirdischen Pflanzenteilen des Rotklee die entgegengesetzte Tendenz zu erkennen. Am deutlichsten auf die K-Düngung reagierte Asparagin im zweiten Schnitt mit einer Abnahme. Die einzige Aminosäure, die durch die variierte K-Ernährung erhöht wurde, war Glutaminsäure.

In der Gesamtfraction der Aminosäuren dominieren Alanin, γ -Aminobuttersäure, Glutaminsäure, Serin und das Säureamid Asparagin. Ihr Anteil beträgt 85-95% an der Gesamtfraction. Glycin, Threonin, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin hingegen waren nur in Spuren vorhanden. Interessanterweise wurde wie bei Vicia (Tabelle 11-14) auch bei Rotklee Glutamin nur in Spuren gefunden. Da auch bei Luzerne (Tabelle 17-18) dieses Säureamid im Gegensatz zum Asparagin nur in sehr geringen Mengen vorlag, darf dieser Befund eine mehr allgemeine Bedeutung für Leguminosen haben.

Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, nahmen mit steigender K-Applikation die absoluten Mengen an einzelnen löslichen Aminosäuren in allen Pflanzenteilen zu. Mit Ausnahme des Asparagingehaltes im 2. Schnitt, der von K_1 nach K_3 um ca. 35% abfiel, wodurch sich der Gesamtgehalt nicht wesentlich veränderte (Tabelle 16).

Tabelle 15

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt

an löslichen Aminosäuren

(Angaben/μmol/100 g Frischsubstanz)

R o t k l e e1
8
1

Wurzel

I. Schnitt

II. Schnitt

Nr.	Aminosäure	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	30	37	55	12	11	16	27	23	29
3	Glutaminsäure	33	42	36	54	65	78	61	83	89
4	Serin	17	26	21	43	40	59	55	45	47
5	Glycin	5	6	5	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
6	Asparagin	132	161	133	77	53	71	299	208	167
7	Threonin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
8	Alanin	33	64	51	171	158	174	172	167	184
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β-Alanin	Sp.	Sp.	Sp.	34	17	15	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	7	7	55	33	52	50	35	31
16	Valin	6	11	11	23	20	20	21	20	18
18	Leucin	7	13	13	30	24	28	25	32	23
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
23	γ-Aminobuttersäure	25	60	49	117	111	109	125	112	111
		288	427	361	616	532	622	835	725	610

Tabelle 16 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge

an löslichen Aminosäuren

(Angaben/μmol/Ertrag)

R o t k l e e

Nr.	Aminosäure	Wurzel			I. Schnitt			II. Schnitt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	59	69	68	18	22	32	62	62	77
3	Glutaminsäure	66	79	70	84	128	156	139	227	239
4	Serin	33	49	41	68	79	118	125	123	126
5	Glyzin	10	10	10	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
6	Asparagin	263	302	260	121	104	141	686	570	450
7	Threonin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
8	Alanin	67	119	100	268	310	348	396	457	496
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β-Alanin	Sp.	Sp.	Sp.	54	33	29	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	13	14	86	65	103	116	97	84
16	Valin	12	21	22	37	40	40	48	54	49
18	Leuzin	15	24	26	47	46	57	58	87	63
21	Phenylalanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
23	γ-Aminobuttersäure	50	112	96	183	216	217	286	308	298
		575	798	707	966	1043	1241	1916	1985	1882

3) Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf
den Gehalt an löslichen Aminosäuren bei Luzerne

In Tabelle 17 sind die Gesamtgehalte an löslichen Amino-
verbindungen der einzelnen Pflanzenteile von Luzerne dar-
gestellt. In den Wurzeln nahm der Gesamtgehalt an löslichen
Aminosäuren und der Gehalt fast aller Aminosäuren ab. Die
erhöhten Kaliumgaben bewirkten nur bei Glutaminsäure und
 γ -Aminobuttersäure einen leichten Anstieg. Im Sproß hin-
gegen blieb der Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren, be-
zogen auf 100 g Frischsubstanz, in beiden Schnitten praktisch
konstant. Die Gehalte an Glutaminsäure, γ -Aminobuttersäure
und Alanin stiegen mit der K-Düngung an. Diese Tendenz ist
sowohl im ersten als auch im zweiten Schnitt zu erkennen.
Während auch hier bei Luzerne das Säureamid Glutamin nicht
nachgewiesen werden konnte, nahm der doch relativ hohe An-
teil an Asparagin mit steigender K-Düngung ab. Auf die übrigen
Aminosäuren hatte die K-Ernährung keinen Einfluß. Die geringen
Unterschiede sind eher zufällig als systematisch.

Bezieht man die Gesamtgehalte an löslichen Aminoverbindungen
auf den Ertrag (Tabelle 18), dann kommt der Einfluß der K-
Düngung deutlicher zum Vorschein. Es zeigte sich, daß die
besser mit K versorgten Knöllchenbakterien in der Lage sind,
den Luftstickstoff mit erhöhter Rate zu assimilieren, was
sich in den Gehalten und dem Spektrum an Aminosäuren wider-
spiegelt.

Tabelle 17 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt
an löslichen Aminosäuren

(Angaben/μmol/100 g Frischsubstanz)

L u z e r n e

Nr.	Aminosäure	Wurzel			I. Schnitt			II. Schnitt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	41	55	33	57	49	45	29	33	44
3	Glutaminsäure	53	87	76	177	215	251	148	178	219
4	Serin	66	26	29	138	131	106	132	112	147
5	Glycin	20	13	11	25	29	26	26	30	29
6	Asparagin	220	258	123	371	310	250	277	206	198
7	Threonin	Sp.	Sp.	Sp.	45	46	45	55	68	66
8	Alanin	87	110	92	377	360	392	351	362	396
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	β-Alanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	42	52	51	28	35
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	104	96	81
15	Prolin	113	61	70	251	179	177	77	120	79
16	Valin	38	39	39	66	63	67	72	72	60
18	Leucin	65	57	61	98	85	104	129	128	112
21	Phenylalanin	35	33	32	50	Sp.	61	78	74	61
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	12	Sp.	25	22	26	28	24
23	γ-Aminobuttersäure	124	130	149	181	203	223	227	234	290

862 869 727 1836 1737 1821 1782 1769 1841

Tabelle 18 Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an löslichen Aminosäuren
 (Angaben $\mu\text{mol/Ertrag}$)

L u z e r n e

Nr.	Aminosäure	Wurzel			I. Schnitt			II. Schnitt		
		K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	84	113	71	39	33	40	51	65	82
3	Glutaminsäure	108	179	166	120	144	220	267	343	412
4	Serin	135	53	62	94	88	93	238	216	277
5	Glycin	20	27	24	17	20	23	47	57	54
6	Asparagin	447	530	267	253	208	220	498	398	372
7	Threonin	Sp.	Sp.	Sp.	31	31	40	98	132	123
8	Alanin	177	226	201	257	242	344	632	700	744
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
10	B-Alanin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	28	46	91	54	65
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	Sp.	188	185	152
15	Prolin	230	125	153	171	120	156	139	232	148
16	Valin	77	80	84	45	43	58	130	139	113
18	Leucin	131	118	133	67	57	92	232	247	210
21	Phenylalanin	70	69	70	34	Sp.	53	141	144	114
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	26	Sp.	17	19	47	54	45
23	δ -Aminobuttersäure	252	268	325	123	136	196	408	452	545
		1731	1788	1582	1251	1167	1600	3207	3418	3456

5) Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf
den Gehalt an löslichen Aminosäuren in den
Knöllchen von Rotklee und Luzerne

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, nimmt mit verbesserter Kaliumversorgung der Gesamtgehalt an löslichen Aminosäuren in den Knöllchen bei Rotklee ab. Auch bei Luzerne zeigt sich von Variante K_1 zu Variante K_2 ein deutlicher Abfall im Gehalt an löslichen Aminosäuren (Tabelle 20). In der Variante K_3 ist der Gehalt an gesamtlöslichen Aminosäuren wieder erhöht. Diese Erhöhung geht ausschließlich auf den hier stark angestiegenen Gehalt an Asparaginsäure zurück (Tabelle 20. Insgesamt fällt auf, daß die Gehalte an löslichen Aminosäuren (Gesamtgehalte) in den Knöllchen um ein Vielfaches höher sind als in den Stengeln und Blättern. Dieser Befund dokumentiert, daß die Knöllchen die pflanzlichen Gewebe sind, in denen die N_2 -Assimilation stattfindet. Besonders auffallend sind die Gehalte an Asparagin, aber auch an Asparaginsäure und Glutaminsäure. Während in den oberirdischen Pflanzenteilen bei Rotklee und Luzerne die Gehalte an Glutaminsäure um ein Mehrfaches höher sind als die Gehalte an Asparaginsäure (Tabelle 15-17), zeigt sich in den Knöllchen eher die umgekehrte Tendenz. Hier sind in den meisten Fällen die Gehalte an Asparaginsäure höher als an Glutaminsäure (Tabelle 19-20).

Es könnte sein, daß bei diesen Pflanzen ähnlich wie MARTIN (1970) bei Buschbohnen festgestellt hat, die erstgebildete Aminosäure Asparaginsäure ist. ZELITCH, WILSON u. BURRIS (1952) fanden hingegen bei Untersuchungen an Sojabohnen, daß die Glutaminsäure als erste bzw. als wichtigste Aminosäure synthetisiert wird und in dreifach höherer Menge vorlag als Asparaginsäure. Wahrscheinlich sind die physiologischen

Vorgänge der AS - Synthese mehr oder weniger artspezifisch.

Asparagin, Serin, Alanin und Valin wurden durch die K-Steigerung in ihrem Gehalt, bezogen auf 100 g FS mehr oder weniger stark negativ beeinflusst. Während im Sproß und in den Wurzeln von Rotklee Phenylalanin und Tyrosin nicht gefunden wurden (Tabelle 15), waren bei den Knöllchen des Rotklee Phenylalanin und Tyrosin, in den Knöllchen der Luzerne Phenylalanin quantitativ nachweisbar.

Abgesehen von quantitativen Unterschieden zwischen den Aminosäurespektren der Knöllchen von Rotklee und Luzerne gab es qualitativ keine besonderen Unterschiede. Während bei den Knöllchen von Rotklee genau wie bei allen anderen Pflanzenteilen Glutamin fehlte, wurde in den Knöllchen von Luzerne eine beachtliche Menge dieses Säureamids gefunden (Tabelle 20), die durch die Kaliumdüngung kaum beeinflusst wurde. Bei Rotklee wurde im Gegensatz zu Luzerne Prolin festgestellt (Tabelle 19).

Die Fraktion der löslichen Aminoverbindungen ist eine labile Fraktion. Sie wird beeinflusst von der Rate an assimiliertem N_2 und von der Rate an Aminosäuren, die für die Proteinsynthese verbraucht werden. Wie aus Untersuchungen von KOCH u. MENGEL (1972, 1971) hervorgeht, begünstigt K^+ bei Nichtleguminosen die Inkorporation von Aminosäuren in Protein. Dementsprechend findet man bei unzureichender K-Ernährung vielfach eine Anreicherung von Säureamiden. Diese Tendenz ist besonders in den oberirdischen Teilen der Leguminosen weniger deutlich ausgeprägt (siehe Tabelle 11, 13, 15, 17). Ja, bei dem Ackerbohnen-Versuch I zeigt sich in den Blättern und Stengeln mit verbesserter K-Ernährung eine deutliche Anreicherung von Asparagin. Da Asparagin und auch Asparaginsäure einen beträchtlichen Anteil an der löslichen Aminofraktion darstellen und besonders auch in den Knöllchen in hohen Mengen auftreten, darf man annehmen, daß sie erste Produkte der N_2 -Assimilation sind und ihre Synthese von Kalium begünstigt wird.

Tabelle 19

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf den Gehalt an löslichen Aminosäuren

(Angaben / μ mol/100 g Frischknöllchen)

R o t k l e e

Nr.	Aminosäure	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	675	806	768
3	Glutaminsäure	453	410	457
4	Serin	146	120	94
5	Glycin	62	50	52
6	Asparagin	1376	1407	1099
7	Threonin	111	73	75
8	Alanin	382	320	360
9	Glutamin	Sp.	Sp.	Sp.
10	β -Alanin	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	78	106	104
16	Valin	111	90	83
18	Leuzin	111	115	116
21	Phenylalanin	76	52	64
22	Tyrosin	36	36	30
23	γ -Aminobuttersäure	138	121	155
		3755	3706	3457

Tabelle 20

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf den Gehalt an löslichen Aminosäuren

(Angaben $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ Frischknöllchen)

L u z e r n e

Nr.	Aminosäure	K ₁	K ₂	K ₃
2	Asparaginsäure	495	299	1253
3	Glutaminsäure	408	364	467
4	Serin	159	112	130
5	Glycin	84	72	60
6	Asparagin	1444	1488	1188
7	Threonin	89	75	79
8	Alanin	413	371	374
9	Glutamin	497	435	477
10	β -Alanin	Sp.	Sp.	Sp.
13	Arginin	Sp.	Sp.	Sp.
15	Prolin	Sp.	Sp.	Sp.
16	Valin	156	125	127
18	Leuzin	243	189	187
21	Phenylalanin	126	110	110
22	Tyrosin	Sp.	Sp.	Sp.
23	γ -Aminobuttersäure	181	140	141
		4294	3780	4593

5) Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung
auf den Gehalt an Aminostickstoff bei
Ackerbohnen

Versuch ^{15}N

Bei diesen Untersuchungen, die Aufschluß über die N_2 -Fixierung und den weiteren Umsatz von N in organische N-Verbindungen geben sollen, wurden nicht die einzelnen Aminosäuren, sondern der Gesamt-Aminostickstoff in den einzelnen Pflanzenorganen bestimmt. Die steigende Kaliumdüngung hatte auf den Gehalt an löslichen Stickstoffverbindungen (Tabelle 21) keinen allzu großen Einfluß. Der Aminostickstoffgehalt in den Knöllchen stieg aber in beiden ^{15}N -Versuchen mit erhöhter Kaliumzufuhr beachtlich an (Tabelle 21). Die lösliche Amino-fraktion nahm im ersten Versuch von K_1 nach K_3 um 11%, im zweiten Versuch von K_1 nach K_2 um 13% bzw. von K_1 nach K_3 um 40% zu. Wenn man den Konzentrationseffekt berücksichtigt und den Gehalt an Aminostickstoff in Bezug auf den Ertrag angibt, ist eine erhöhte Stickstoff-Fixierung durch die gesteigerte K-Applikation zu erkennen. Wie aus Tabelle 22 zu entnehmen ist, wurden die Mengen an Aminostickstoff beachtlich erhöht. Im ersten Versuch stiegen diese von K_1 nach K_3 im Blatt um 27%, im Stengel um 22%, in den Wurzeln um 30% und in den Knöllchen sogar um 45% an. Betrachtet man den Anstieg des Aminostickstoffs in der Gesamtpflanze, so betrug dieser 29%.

Im zweiten Versuch, in dem der Kaliumgehalt der Pflanzen der 3 Kalistufen besser differenziert war (siehe Tabelle 5), trat die Steigerungsrate an Aminostickstoff deutlicher in Erscheinung (Tabelle 22). Die Aminostickstoffmengen stiegen hier von K_1 nach K_3 im Blatt um 35%, im Stengel um 53%, in den Wurzeln um 20% und in den Knöllchen um 43% an. Die Steigerungsraten auf die Gesamtpflanze bezogen betrugen von K_1 nach K_2 29% und von K_1 nach K_3 40%.

Tabelle 21

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gesamtgehalt
an löslichen Aminoverbindungen bei Ackerbohnen
(Angaben mg N/100 g Frischsubstanz)

15-N-Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen
K ₁	73,86	45,19	25,92	202,17 (100)
K ₃	74,63	48,53	27,04	224,53 (111)
K ₁	82,78	56,04	22,99	182,06 (100)
K ₂	83,81	40,84	20,31	206,42 (113)
K ₃	79,65	42,55	18,61	254,4 (140)

Tabelle 22

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an löslichen Aminoerbindungen bei Ackerbohnen
 (Angaben mg N/100 g Frischsubstanz)

¹⁵N-Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen	Summe
K ₁	32,31 (100)	16,66 (100)	16,72 (100)	10,65 (100)	76,32 (100)
K ₃	40,9 (127)	20,31 (122)	21,78 (130)	15,56 (145)	98,55 (129)
K ₁	64,44 (100)	24,09 (100)	17,86 (100)	13,76 (100)	120,15 (100)
K ₂	81,17 (126)	34,09 (141)	21,65 (121)	18,56 (135)	155,44 (129)
K ₃	87,1 (135)	36,8 (153)	21,42 (120)	25,39 (145)	170,71 (140)

C. Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung
=====

auf den Gehalt an Protein-Stickstoff (Rest-N)

=====

Die Vermutung von THOMAS u. KRAUS (1955), WERK (1959), THOMPSON u. MORRIS (1956), daß bei guter Kalium-Versorgung die löslichen Aminoverbindungen mit erhöhter Intensität für den Proteinaufbau verwendet werden, läßt sich nicht bestreiten, obwohl erhöhte Kaliumgaben bei den hier untersuchten Leguminosen sowohl bei Ackerbohnen als auch bei Rotklee und Luzerne keine Erhöhungen der Proteinfraction, bezogen auf 100 g FS mit sich brachten (Tabelle 23, 24, 25). Dies ist einerseits auf einen Konzentrations-, bzw. Verdünnungseffekt, andererseits auf den Erntezeitpunkt zurückzuführen, der bei allen Untersuchungen in der vegetativen Phase lag. Die Vermutung der obengenannten Autoren wird bestätigt durch die Ergebnisse der Untersuchungen über die ^{15}N - Aufnahme bei Ackerbohnen in dieser Arbeit, die später beschrieben werden. Immerhin erhöhte eine gesteigerte Kaliumgabe die Menge an Protein-Stickstoff je Pflanze beachtlich. Wie aus Tabelle 26 zu ersehen ist, stieg die Proteinmenge bei Ackerbohnen (Versuch I) von K_1 über K_2 nach K_3 um 17%. Die Steigerungsrate in den einzelnen Pflanzenteilen betrug in den Blättern 18%, im Stengel 10% und in den Wurzeln 7%.

In dem zweiten Ackerbohnen-Versuch konnte eine Steigerung von K_1 nach K_3 in den Blättern von 18%, in den Stengeln von 13% und in den Wurzeln von 29% erreicht werden (Tabelle 26).

Eine ähnliche Tendenz ergaben die Protein-Stickstoffgehalte bei Rotklee und Luzerne (Tabelle 27), sowie bei den ^{15}N -

Versuchen mit Ackerbohnen. Am deutlichsten zeigte sich eine Steigerung des Protein-N-Gehaltes in den Ackerbohnenpflanzen des zweiten ¹⁵N-Versuches, deren Kaliumgehalte sehr deutlich differenziert waren (siehe Tabelle 5). Hier stieg die Proteinmenge mit der K-Steigerung im Blatt um 43%, im Stengel um 35%, in den Wurzeln um 30% und in den Knöllchen sogar um 48% kontinuierlich an (Tabelle 28).

Tabelle 23

Der Einfluß einer Gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt
an Protein-Stickstoff bei Ackerbohnen

(Angaben in mg N/100 g Frischsubstanz)

Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel
K ₁	591	138	183
K ₂	607	139	181
K ₃	609	131	194
K ₁	667	178	228
K ₂	670	180	211
K ₃	622	171	238

Tabelle 24

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt
an Protein-Stickstoff bei Rotklee und Luzerne
(Angaben in mg N/100 g Frischsubstanz)

Rotklee

	I. Schnitt	II. Schnitt	Wurzel
K ₁	557	438	150
K ₂	447	443	150
K ₃	482	430	147

Luzerne

K ₁	622	599	168
K ₂	570	495	166
K ₃	568	535	181

¹⁵N-Versuch I u. II

Tabelle 25

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf den Gehalt
an Protein-Stickstoff bei Ackerbohnen
 (Angaben in mg N/100 g Frischsubstanz)

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen
K ₁	542	151	160	738
K ₅	545	140	166	696
K ₁	584,28	154,71	200,01	690,27
K ₂	605,27	159,57	154,26	698,08
K ₅	595,62	140,19	170,05	775,56

Tabelle 26
Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an Protein-Stickstoff bei Ackerbohnen
 (Angaben in mg N/Ertrag)

Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Gesamt
K ₁	398 (100)	85 (100)	228 (100)	699 (100)
K ₂	447 (112)	90 (108)	257 (104)	774 (111)
K ₃	470 (118)	91 (110)	244 (107)	815 (117)
K ₁	492 (100)	100 (100)	250 (100)	842 (100)
K ₂	569 (116)	118 (118)	264 (106)	951 (113)
K ₃	582 (118)	113 (113)	322 (129)	1017 (121)

Tabelle 27

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Menge
an Protein-Stickstoff bei Rotklee und Luzerne

(Angaben in mg N/Ertrag)

Rotklee

	I. Schnitt	II. Schnitt	Wurzel	Gesamt
K ₁	858 (100)	1023 (100)	291 (100)	2172 (100)
K ₂	884 (103)	1257 (123)	272 (93)	2412 (111)
K ₃	966 (113)	1156 (113)	277 (95)	2399 (110)

Luzerne

K ₁	425 (100)	1077 (100)	328 (100)	1830 (100)
K ₂	383 (90)	966 (90)	328 (100)	1677 (92)
K ₃	508 (120)	995 (93)	381 (116)	1884 (103)

Tabelle 28

Der Einfluß einer kesteigerten K-Düngung auf die Menge
an Protein-Stickstoff bei Ackerbohnen
(Angaben in mg N/Ertrag)

¹⁵N-Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen	Gesamt
K ₁	237 (100)	48 (100)	95 (100)	39 (100)	419 (100)
K ₃	298 (126)	59 (123)	122 (128)	48 (123)	526 (126)
K ₁	454,86 (100)	90,05 (100)	155,37 (100)	52,18 (100)	752,46 (100)
K ₂	584,27 (128)	116,4 (129)	164,44 (106)	62,76 (120)	927,87 (123)
K ₃	649,12 (143)	121,26 (133)	195,74 (130)	77,58 (148)	1043,5 (139)

D) Verteilung von markiertem ^{14}C in Zuckern und
Aminosäuren in den Knöllchen von Ackerbohnen
in Abhängigkeit von der Kaliumernährung

In der Literatur wurde des öfteren über die Beziehung zwischen Photoassimilationsrate der Pflanze und Stickstoff-Fixierung der Knöllchenbakterien geschrieben (BACH, MAGEE u. BURRIS 1958), (VIRTANEN, MOISIO u. BURRIS 1955). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, in welchen Raten sich das kurzfristig assimilierte markierte $^{14}\text{CO}_2$ in den Zucker- und Aminosäurefraktionen verteilte (Tabelle 29)

Tabelle 29 Die Menge an assimiliertem ^{14}C in den
Zucker- und Aminosäure-Fractionen in
den Knöllchen von Ackerbohnen in Ab-
hängigkeit von der K-Düngung
 (Angaben in Imp/Min/g Knöllchen)

Versuch I

	Zucker		Aminosäure	
	abs.	rel.	abs.	rel.
K ₁	282880	(100)	412400	(100)
K ₃	294552	(104)	545172	(132)

Versuch II

K ₁	203163	(100)	177458	(100)
K ₂	266175	(131)	338220	(191)
K ₃	224222	(110)	427752	(241)

Während im ersten Versuch, der mit zwei K-Stufen durchgeführt wurde, der Markierungsgrad in der Zuckerfraktion bei Steigerung der Kaliungabe um 4% erhöht wurde, konnte gleichzeitig in der löslichen Aminosäurefraktion eine Erhöhung um 32% festgestellt werden.

Wie weiter aus Tabelle 29 zu ersehen ist, zeigte der zweite Versuch den positiven Einfluß der K-Ernährung auf die Inkorporierung von markiertem C in die Zucker- und besonders in die Aminosäurefraktion noch deutlicher. Die Steigerung des Markierungsgrades in der Zuckerfraktion betrug hier von K_1 nach K_2 31% und von K_1 nach K_3 10%. Der Anteil an markierten Zuckern nahm also von Variante K_2 nach Variante K_3 um 16% ab. Wenn man den Markierungsgrad der Aminosäurefraktion der K_3 -Stufe betrachtet, läßt sich diese Abnahme leicht erklären. Es wurde nämlich in der K_3 -Variante das assimilierte $^{14}\text{CO}_2$ mit wesentlich größerer Intensität aus der Zuckerfraktion in die Fraktion der Aminosäuren überführt. Somit erklärt sich der kontinuierliche Anstieg des Markierungsgrades der Aminosäurefraktion mit erhöhter K-Applikation. Die Steigerungsraten betrugen von K_1 nach K_2 91%, bzw. von K_1 nach K_3 141%.

E) Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf
=====
den Gehalt an markiertem Stickstoff (^{15}N) in
=====
der Aminosäure- und Proteinfraction bei jungen
=====

Ackerbohnen
=====

Mehrere Autoren u.a. MENGEL u.KOCH (1971) berichten, daß der Gehalt an löslichem Aminostickstoff bei schlecht mit Kalium versorgten Pflanzen ansteigt, während gleichzeitig die Proteinbildung langsamer verläuft. Diese Untersuchungsergebnisse, die bei Nichtleguminosen erzielt worden sind, wurden des öfteren bestätigt (RATNER u.YELISEOVA 1968). Untersuchungen von MENGEL u.KOCH (1971) an Sonnenblumen zeigten darüberhinaus, daß eine verbesserte K-Ernährung den Umbau von Nitratstickstoff in lösliche Aminoverbindungen begünstigt. In analoger Weise zeigen auch die hier an Vicia durchgeführten Versuche den positiven Einfluß des Kaliums auf die Inkorporation von N_2 in die lösliche Amino-fraction. Es wurde nämlich mit steigender Kalium-Applikation eine Zunahme an Amino- und auch an Protein- ^{15}N -Stickstoff festgestellt. Dieses Ergebnis wurde durch einen Parallelversuch bestätigt. Wie der Tabelle 30 zu entnehmen ist, wurde durch die gesteigerte Kaliumzufuhr eine Erhöhung an markiertem Aminostickstoff in den Stengeln und Wurzeln jeweils um 24% und in den Knöllchen um 13% erreicht. In dem zweiten Versuch mit 3 K-Düngungsstufen war die Steigerungsrate noch ausgeprägter. Sie betrug von Variante K_1 über K_2 nach K_3 in den Stengeln 59%, in den Wurzeln 28% und in den Knöllchen sogar 65%. Bei beiden Versuchen wurde keine Zunahme an markiertem löslichen Aminostickstoff in den Blättern durch eine erhöhte Kaliumgabe beobachtet, d.h. der Umsatz von N_2 zu organisch gebundenem N wurde nachhaltig durch Kalium gesteigert.

Tabelle 30

Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung auf die Inkorporierung
von markiertem Stickstoff (^{15}N) in die lösliche Aminofraktion
innerhalb von 12 Std. bei jungen Ackerbohnen
 (Angaben in $\mu\text{g } ^{15}\text{N}/100 \text{ g Frischsubstanz}$)

Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen
K ₁	384 (100)	284,7 (100)	137,4 (100)	2506,9 (100)
K ₃	403 (105)	354,5 (124)	170,35 (124)	2829,9 (113)
K ₁	140,7 (100)	95,7 (100)	39,1 (100)	2111,9 (100)
K ₂	142,5 (101)	114,35 (122)	48,7 (125)	2497,7 (118)
K ₃	135,4 (96)	148,9 (159)	50,2 (128)	3485,5 (165)

Wie schon erwähnt, ging auch der Transfer des Aminostickstoffs vom Aminosäurepool zur Proteinfraktion mit verbesserter Kaliumgabe mit erhöhter Intensität vor sich (Tabelle 31). Das bewirkte in dem ersten ¹⁵N-Versuch eine Steigerung des markierten Protein-Stickstoffs in der Proteinfraktion von Variante K₁ nach K₃ in den Blättern von 34%, in den Stengeln von 75%, in den Wurzeln von 4% und in den Knöllchen von 24%. Die Zuwachsrate im zweiten Versuch war noch deutlicher ausgeprägt und betrug von der niedrigsten K-Variante bis zur höchsten K-Variante in den Blättern 42%, in den Stengeln 15%, in den Wurzeln 198% und in den Knöllchen 51%.

Es soll hier noch betont werden, daß der Anstieg des markierten Stickstoffs in der Aminosäure- und Protein-Stickstoff-Fraktion, bezogen auf gleiche Pflanzenmasse, die physiologische Bedeutung des Kaliumernährungszustandes für die Synthese der organischen Stickstoffverbindungen unterstreicht.

In den Tabellen 32 und 33 wurde die Menge an inkorporiertem, markiertem Stickstoff, bezogen auf den Ertrag, angegeben. Die hohe Intensität, mit der der Luftstickstoff durch die Knöllchenbakterien in Abhängigkeit von der verbesserten K-Ernährung aufgenommen und weiter in die organischen N-Verbindungen verarbeitet wurde, kommt hier deutlich zum Ausdruck.

Alle die beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß mit verbesserter Kaliumernährung das Wachstum der verschiedenen Leguminosenpflanzen begünstigt wird.

Da hierbei der Gehalt an löslichen Aminoverbindungen und auch an Protein-Stickstoff nicht wesentlich verändert wird, bedeutet dieses, daß mit verbesserter Kaliumernährung auch die Menge an fixiertem molekularen Stickstoff - bezogen auf die Einzelpflanze - deutlich ansteigt. Das zeigt sich in den verschiedenen Untersuchungen (siehe Tabelle 12, 14, 16, 18, 22, 26, 27, 28). Der Gehalt und die

Versuch I n. II

Tabelle 31

Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung auf die Inkorporierung von markiertem Stickstoff ($^{15}\text{N}_2$) in die Proteinfraction innerhalb von 12 Stunden bei jungen Ackerbohnen
(Angaben in $\mu\text{g } ^{15}\text{N}/100 \text{ g Frischsubstanz}$)

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen
K ₁	325 (100)	144 (100)	64 (100)	1181 (100)
K ₅	434 (134)	252 (175)	66,4 (104)	1462 (124)

K ₁	151,9 (100)	66 (100)	20 (100)	524,6 (100)
K ₂	223,2 (147)	51,64 (78)	29,3 (147)	586,4 (112)
K ₅	215,7 (142)	75,7 (115)	59,5 (298)	790,9 (151)

Tabelle 32

Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung auf die Inkorporierung
von markiertem Stickstoff ($^{15}\text{N}_2$) in die lösliche Aminofraktion
innerhalb von 12 Stunden bei jungen Ackerbohnen

(Angaben in mg $^{15}\text{N}/5$ Pflanzen)

Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen	Gesamt
K ₁	168 (100)	104,96 (100)	88,62 (100)	131,81 (100)	493,39 (100)
K ₃	221 (132)	148,26 (141)	137,2 (155)	193,54 (147)	700,8 (142)
K ₁	109,6 (100)	62,6 (100)	30,4 (100)	159,6 (100)	362,2 (100)
K ₂	138,0 (126)	95,4 (152)	52,0 (171)	224,6 (141)	510 (141)
K ₃	148,0 (135)	128,8 (206)	57,8 (190)	347,8 (218)	682,4 (188)

Tabelle 32
Der Einfluß einer gesteigerten K-Ernährung auf die Inkorporierung
von markiertem Stickstoff ($^{15}\text{N}_2$) in die Proteinfraktion innerhalb
von 12 Stunden bei jungen Ackerbohnen
 (Angaben in $\mu\text{g } ^{15}\text{N} / 5$ Pflanzen)

Versuch I u. II

	Blatt	Stengel	Wurzel	Knöllchen	Gesamt
K ₁	142,2 (100)	52,8 (100)	38 (100)	62,5 (100)	295,5 (100)
K ₃	238,4 (168)	106,2 (201)	48,8 (128)	100,8 (161)	494,2 (167)
K ₁	118,26 (100)	44,12 (100)	15,5 (100)	39,66 (100)	217,54 (100)
K ₂	216,18 (183)	43,06 (98)	31,24 (202)	52,77 (153)	343,2 (158)
K ₃	233,7 (198)	65,5 (148)	68,5 (442)	78,93 (199)	446,63 (205)

Zusammensetzung an löslichen Aminosäuren unterscheidet sich etwas von dem bei den Nichtleguminosen. Es zeigt sich nämlich, wie bereits ausgeführt, daß mit verbesserter Kaliumernährung der Gehalt an Säureamiden kaum verändert wird. Dieser Befund berechtigt zur Vermutung, daß die K-Ernährung auch mehr direkt die Assimilation von N_2 begünstigt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigt der Versuch mit markiertem CO_2 , daß mit verbesserter Kaliumernährung die markierten Assimilate vermehrt in der Aminofraktion und weniger in der Zuckerfraktion zu finden sind. Das bedeutet, daß die Pflanze mit dem besserem K-Ernährungszustand auch vermehrt Stickstoff zur Verfügung hat, um die von der Wirtspflanze gelieferten Assimilate zu Aminosäuren bzw. Protein umzubauen.

Um den direkten Beweis zu erbringen, daß die Pflanzen mit dem besseren K-Zustand höhere Raten an N_2 assimilieren, wurden die beiden oben beschriebenen Versuche mit markiertem Stickstoff durchgeführt.

(Methodik dieser Untersuchungen siehe Seite 11-13 u. 16-23)

Bei derartigen kurzfristigen Versuchen werden sekundäre Einwirkungen ausgeschaltet, die bei Langzeitversuchen nicht zu vermeiden sind. Die Ergebnisse dieser beiden an Ackerbohnen durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 30 dargelegt. Hier zeigt sich sehr eindeutig, daß die Pflanzen mit dem höheren Gehalt an Kalium in der Zeiteinheit deutlich mehr N_2 inkorporieren. Der Unterschied ist besonders in den Knöllchen, in den Wurzeln und in den Stengeln evident, während in den Blättern die Differenzierung in Abhängigkeit von der unterschiedlichen K-Versorgung bei den löslichen Aminoverbindungen weniger stark ausgeprägt ist. Die Menge an markiertem N, welche in der Protein-Fraktion wiedergefunden wurde, ist noch stärker vom K-Ernährungszustand beeinflusst (Tabelle 31). Gerade im Versuch II, der ja auch in den K-Gehalten der einzelnen Varianten recht unterschiedlich war, zeigt sich der

positive Einfluß des Kaliums auf die Assimilation von N_2 recht deutlich. So wurde in den Wurzeln von K_1 nach K_3 198% mehr markierter N_2 vorgefunden. Diese Untersuchungen belegen insgesamt gesehen recht deutlich, daß die Leguminosenpflanze mit dem besseren K-Ernährungszustand höhere Raten an Luftstickstoff assimiliert.

Ob diese Begünstigung der N_2 -Assimilation eine direkte Einwirkung des K auf die Enzym-Systeme der Rhizobium-Bakterien zurückgeht, oder ob der bessere Kohlenhydratzustand der reichlich mit K versorgten Pflanzen die erhöhte N_2 Assimilation bewirkt, ist eine Frage, die in der Diskussion erläutert wird.

Biochemie der mikrobiologischen N_2 - Fixierung

=====

Stickstoff ist das Element, das in der Atmosphäre in größter Menge vorkommt, und es ist ein Hauptbestandteil aller lebenden Organismen. Stickstoffverbindungen, die für die Ernährung von Lebewesen von Nutzen sind, werden durch eine Anzahl verschiedener Prozesse zur Verfügung gestellt, die sich in Größenordnung und Bedeutung stark unterscheiden. Bei Gewittern werden kleine Mengen atmosphärischen Stickstoffgases durch elektrische Entladung in Salpetersäure umgewandelt (VIRTANEN u. MIETTINEN 1963). Bei Verwitterungsprozessen wird etwas Ammonstickstoff aus einigen Gesteinsarten freigesetzt. Eine jährlich ständig steigende Menge Stickstoffs aus der Luft wird nach dem Haber-Bosch-Verfahren industriell zu Ammoniak reduziert. Wieviel Stickstoff durch die verschiedenen Prozesse der Biosphäre zugeführt wird, ist nicht genau bekannt, aber man ist sich allgemein einig (ALLEN u. ALLEN 1958), daß die biologische Bindung von Stickstoffgas von großer Bedeutung ist und daß sie einige 100 Mill.to Stickstoff pro Jahr beträgt (DONALD 1960). Alle anderen Prozesse einschließlich des Haber-Bosch-Verfahrens machen von der Gesamtmenge an N_2 , welche jährlich in die Biosphäre überführt wird, nur etwa 10% aus. Relativ wenige Organismen besitzen die Fähigkeit, atmosphärischen Stickstoff in Stickstoffverbindungen umzuwandeln. Zu diesen zählen freilebende Bakterien, wie z.B. Azotobakter, Beijerinckia, Chromatium, Clostridium und Klebsiella. Auch einige Blaualgen-Arten fixieren Stickstoff, z.B. Anabaena, Calothrix, Nostoc und Tolypothrix (BURRIS 1965). Zu den Nichtleguminosen, die die Fähigkeit haben, in Symbiose Luftstickstoff zu fixieren, werden u.a. Alnus-, Myrica-, Hippophae-, Casuarina- und Ceanothus-Arten gezählt (BOND 1963).

Schon seit Jahrhunderten ist den Landwirten bekannt, daß Leguminosen die Bodenproduktivität verbessern. Wir wissen

heute, daß diese Eigenschaft auf die bemerkenswerte Fähigkeit der Leguminosen-Rhizobium-Symbiose, atmosphärischen Stickstoff in Ammoniak umzuwandeln, zurückzuführen ist. Es gibt Beschreibungen von ca. 13 000 Leguminosearten, und es steht fest, daß die meisten davon mit Knöllchen besiedelt sind (ALLEN u. ALLEN 1958; BURRIS 1965). Man kennt für jede Leguminosengruppe spezifische Rhizobienarten, nämlich:

Rhizobium	Leguminosenart
R. meliloti	Honigklee (Melilotus) Luzerne (Medicago sativa)
R. trifolii	Rotklee (Trifolium pratense) Weißklee (Trifolium repens)
R. leguminosarum	Erbse (Pisum sativum) Saubohne (Vicia faba)
R. phaseoli	Gartenbohne (Phaseolus vulgaris)
R. japonicum	Sojabohne (Glycine max)
R. lupinii	Lupine (Lupinus)

Über die Knöllchenbildung berichtete THORNTON (1936), daß Rhizobiumzellen sich nahe der Wurzelhaarspitze der Gastpflanze ansammeln, weil dort Nährstoffe ausgeschieden werden. Die Absonderung eines Polysaccharidschleimes durch die Bakterien führt dazu, daß die Pflanzen Polygalakturonase produzieren, die für das Eindringen der Bakterien in die Wurzeln förderlich ist. Es wird angenommen, daß die spezifische Bindung bestimmter Rhizobienarten an gewisse Leguminosen mit der von den Bakterien gebildeten Polysaccharid-Art zusammenhängt. Die Bildung von Wachstumssubstanzen durch die Bakterien bewirkt eine Krümmung der Wurzelhaare. So entsteht ein Infektionsfaden, der sich durch

Das Wurzelhaar bis zum Perizykel zieht. Die Bakterien in diesem Infektionsträger vermehren sich, sobald er durch die Kortezellen der Wurzel hindurchgeht. Wenn der Infektionsträger eine der wenigen tetraploiden Zellen im Innern des Kortex erreicht hat, werden die Bakterien freigesetzt, und sowohl die tetraploiden wie auch die benachbarten diploiden Zellen werden durch einen unbekannten Mechanismus zu meristematischer Aktivität angeregt. Sobald diese Zellen sich teilen und das Knöllchen sich vergrößert, teilen sich die Bakterien und werden schließlich zu Gruppen von zwei, drei oder mehr in einer Membranhülle eingeschlossen (BERGERSEN 1960). Bei vielen Rhizobienarten nehmen die Bakterien innerhalb der Knöllchen seltsame Formen an. Sie werden als Bakterioide bezeichnet. In den Membranhüllen, die die Bakterioide umgeben, befindet sich eine verhältnismäßig hohe Konzentration eines roten Pigments, das zuerst von KUBO (1939) als ein Hämoglobin identifiziert wurde. Es besteht eine klare Beziehung zwischen dem Hämoglobingehalt der Knöllchen und der Fähigkeit der Stickstoff-Fixierung (VIRTANEN u. MIETTINEN 1963), auf die später nochmals hingewiesen wird.

Die Frage, wo sich die Primärreaktion bei der Stickstoff-Fixierung im Knöllchen abspielt, wurde des öfteren untersucht, und viele dieser Versuche schlugen fehl. Die Ungewißheit über den Ort dieser Reaktion im Knöllchen konnte erst durch die Verwendung von Bakteroidsuspension von Sojabohnen-Knöllchen behoben werden, die unter anaeroben Bedingungen hergestellt wurde. Diese fixierte N_2 unter niedrigen O_2 - Teildrucken ohne weitere Zugabe (BERGERSEN 1966, 1967; KOCH, EVANS, RUSSEL 1967). Bei der N_2 -Fixierung durch Bakteroidsuspension entstand NH_3 , das frei vorlag. Die Bakteroidsuspensionen von Erbsen und Lupinen fixierten ebenfalls N_2 (DIXSON 1968). Die Pflanzenkomponenten beim symbiotischen System der Leguminosen haben also nur eine Hilfsfunktion und sind nicht direkt an der Reduktion von N_2 zu NH_3 beteiligt. Die von den Blättern zu den Knöllchen von Sojabohnen verlagerten Photosynthese-

produkte enthalten hauptsächlich Saccharose, Glucose, eine unbekannte neutrale Verbindung und organische Säuren (BACH, MAGEE, BURRIS 1968). Obwohl die organischen Säuren in den Knöllchen nicht in so großer Menge vorhanden sind wie die Zucker, haben sie sich aber als bestes Substrat zur Förderung der Atmung von Bakteroidsuspensionen erwiesen, die aus gemahlenen Knöllchen in Pufferlösung an Luft hergestellt wurden (BERGERSEN 1958). Die Zucker waren viel weniger wirksam.

Eine hohe endogene stickstoffbindende Aktivität blieb in Sojabohnen-Bakteroiden aufrecht erhalten, wenn sie unter anaeroben Bedingungen in Pufferlösung mit 0,3 M Saccharose behandelt wurden. Wurden sie jedoch in einer Pufferlösung gewaschen, die keine Saccharose enthielt, war die Aktivität erniedrigt. Succinat bewirkte, daß die N_2 -Bindung auf das frühere Maß zurückgeführt wurde, aber Fumarat und Pyruvat waren weniger wirksam. Saccharose in Substratkonzentrationen förderte die N_2 -Bindung nicht (BERGERSEN u. TURNER 1967). KIDBY (1966) wies nach, daß im Knöllchen von Seradella eine Pflanzeninvertase vorkommt. Man nimmt deshalb an, daß die Saccharose, welche die wichtigste Assimilattransportform ist, im Knöllchen durch Invertase in Hexosen gespalten wird, welche das eigentliche Substrat der Stickstoffbindung im Bakteroid darstellen.

Mitochondrien der Gastzellen finden sich besonders an der äußeren Grenze der Zentralgewebezellen von Sojabohnen-Knöllchen (GOODCHILD, BERGERSEN 1966). Diese Mitochondrien waren aktiv, obwohl ihre Phosphorylierungsquotienten niedrig waren (MUECKE, WISKICH 1969). Es wird angenommen, daß der oxydative Abbau von Assimilaten in diesen Organellen zu Substraten führt, die von dem R.-Bakteroid benötigt werden (Präliminarstoffwechsel).

Während der Knöllchenentwicklung und Stickstoff-Fixierung speichern die Bakterioide von Sojabohnen große Mengen von Poly - β - Hydroxy - Buttersäure, die bis zu 40% des Trockengewichtes der Bakterioide betragen können (KLUCAS, EVANS 1968). In Bakteroiden ist β - Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase vorhanden (KLUCAS, EVANS 1967). Dieses Enzym katalysiert die Oxydation von Poly - β - Hydroxybuttersäure, welche sowohl zur ATP-Bildung als auch zur Bildung reduzierter Coenzyme (NADH) bei - trägt. Nach BERGENSEN (1971) kann über diesen Mechanismus die N_2 - Fixierung in Sojabohnenknöllchen auch bei Dunkelheit bewerkstelligt werden; wenn dem so ist, kann die Depolymerisierungsrate von β - Hydroxybuttersäure der limitierende Faktor bei der Stickstoffbindung sein, falls keine anderen Assimilate vorhanden sind. Dehydrierung von β - Hydroxy - Butyrat führt zur Bildung von Aceto-Acetat, welches ein Vorläufer von Acetyl CoA sein kann. Die Möglichkeit, daß dies mit dem Stoffwechsel von organischen Säuren in Bakteroiden über den Glyoxylat - Zyklus in Verbindung steht, wurde von JOHANSON, EVANS und CHING 1966 untersucht. Sie fanden Malat-Syntheseaktivität in Bakteroiden von Saubohnen, Sojabohnen und Lupinenknöllchen. Isozitratelyaseaktivität wurde jedoch nicht nachgewiesen, obwohl diese bei den gleichen Bakterien durch Oleat induziert werden konnte. Es ist daher wahrscheinlich, daß nicht der Glyoxylat - Zyklus, sondern der Tricarbonsäurezyklus in Bakteroiden den Assimilatumbau bewirkt, wie dies auch von zahlreichen Autoren vermutet wird (JORDAN 1962).

Es hat sich gezeigt, daß bei der Herstellung von Bakteroid - suspensionen unbedingt anaerobe Bedingungen eingehalten werden müssen, wenn die Aktivität für die Stickstoffbindung erhalten bleiben soll. Das ist auf zwei Ursachen zurückzuführen:

1. wird die Nitrogenase selbst durch Sauerstoff inaktiviert und
2. enthalten homogenisierte Knöllchenpräparate große Mengen Phenolstoffe und Phenoloxidasen, deren Oxydationsprodukte die

Nitrogenase inaktivieren. KOCH, EVANS u. RUSSEL 1967 verwendeten festes Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Ascorbatpuffer, um damit das Homogenat von Phenolverbindungen zu reinigen. Wie die Tabelle zeigt, waren die so gereinigten Präparate wesentlich wirksamer in der Bildung von Äthylen. Äthylen gilt hierbei als Maß für das Vermögen N_2 zu reduzieren. Auch ein Zusatz von Ascorbat erhöhte die Effektivität der Homogenate beachtlich.

Tabelle 34 Einfluß von PVP und Ascorbat auf die Azethylen-
reduktion von KOCH, EVANS, RUSSEL 1967

Präparat	produzierte Äthylen		
	30 min	45 min	60 min
	/umol	/umol	/umol
mit PVP	0,97	5,93	7,52
ohne PVP	0,04	0,06	0,08
mit PVP u. 0,3 M Ascorbat	5,34	13,92	14,11
ohne PVP u. 0,3 M Ascorbat	0,21	0,46	0,48

Die phenolischen Substanzen in mazeriertem Pflanzengewebe reagieren mit Peptidbindungen von Proteinen und verändern sie. Wenn die Gewebe unter anaeroben Bedingungen und bei Vorhandensein eines Reduktionsmittels und hoher PVP-Konzentration mazeriert werden, bilden die Phenole über Wasserstoffbindungsreaktionen Komplexe mit PVP. Der unlösliche PVP - Phenol-Komplex wird dann durch Filtrieren entfernt, so daß aktiver Extrakt übrigbleibt. Derartig hergestellte Präparate überprüft man mit dem Azethylen-test. Hierbei wird Azethylen zu Äthylen reduziert. Die Reduktion ist der Reduktion von N_2 zu NH_3 analog. Die Menge an produziertem Äthylen ist ein Maß für das N_2 -Fixierungsvermögen. Für die Reaktion waren anaerobe Bedingungen, Natriumdithionit und ein Mechanismus der ATP-Bildung erforderlich (KOCH, EVANS, RUSSEL 1967), wie aus Tabelle 35 hervorgeht.

Tabelle 35

Einfluß energiereicher und reduzierender
Verbindungen auf die Reduktion von Äzethylen
zu Äthylen

Reaktionsverbindungen	Äthylenproduktion
	/ $\mu\text{mol/h}$
total (= alle Reagentien)	9,63
ohne ATP	< 0,01
ohne Kreatinphosphat	< 0,01
ohne Kreatinkinase	7,27
ohne $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	< 0,01
total mit gekochtem Extrakt	< 0,01

Die Rohextrakte reduzierten auch aktiv Stickstoffgas zu NH_3 . Bei diesem System spielen N_2 , der Mechanismus der ATP-Bildung und Natriumdithionit eine Rolle. Durch Zugabe von MgCl_2 und Kreatinphosphokinase (beides Bestandteile des Mechanismus der ATP-Bildung) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht (Tabelle 36). BULEN, BURNS u. LECOMTE 1965 und auch BURRIS 1966 sind mit ihren Versuchen zu den gleichen Ergebnissen gekommen.

Welche Rolle das Leghämoglobin in dem Gesamtsystem spielt, wurde des öfteren untersucht. Es wurde angenommen, daß das Leghämoglobin folgende Aufgaben hat: O_2 -Bindung (KEILIN, SMITH 1947), Auslösung der Hydroxylamin-Reduktion (VIRTANEN, KEMPPII 1954), Mitwirkung bei der Oxydationsreduktion (BERGERSEN 1960; VIRTANEN 1945; VIRTANEN, LAINE 1946), Mitwirkung bei der Bildung von freien Radikalen (BAUER 1960).

Tabelle 36 Notwendige Reagentien zur N₂-Bindung in
zellfreiem Extrakt (KOCH, EVANS u. RUSSEL 1967)

	$\mu\text{mol } 10^{-3} \text{ NH}_3 / \text{min/mg Protein}$
total (alle Reagentien)	3,5
ohne N ₂ oder ¹⁵ N ₂	0,2
ohne ATP-System	0,0
ohne Na ₂ S ₂ O ₄	0,2
ohne ATP	0,0
ohne MgCl ₂	1,4
ohne Kreatinphosphat	0,4
ohne Kreatinphosphokinase	0,6

Alle diese Vermutungen werden in der Literatur als unsicher bezeichnet und teils abgelehnt. SCHOLANDER (1960) wies nach, daß die O₂-Diffusion durch eine Membran, die mit Hämoglobin oder Myoglobin abgesättigt war, viel schneller ablief als die N₂-Diffusion im gleichen System. Er nimmt an, daß dieser Prozeß beschleunigter Diffusion ein wichtiges Mittel für die O₂ Translokation innerhalb von Geweben ist, die einen hohen O₂ Verbrauch haben und Proteine, wie Hämoglobin und Myoglobin enthalten. In den Wurzelknöllchen von Leguminosen ist O₂ für die Bakteroidatmung die daraus resultierende Versorgung mit ATP für die Stickstoffbindung erforderlich. In atmosphärischen Konzentrationen ist O₂ häufig ein limitierender Faktor. So inaktiviert O₂ auch die Nitrogenase, er kann auch hemmend auf die Stickstoffbindung wirken (BERGERSEN 1962, 1963). Für das Funktionieren der Knöllchen ist es deshalb erforderlich, daß genügend hohe Mengen O₂ für eine ausreichende Versorgung mit ATP angeliefert werden, aber diese Mengen müssen andererseits auch

wieder so niedrig sein, daß ein Anstieg der Konzentration von freiem O_2 an der Bakteroid-Oberfläche vermieden wird. Ohne Leghämoglobin wäre die O_2 -Diffusion durch das dichte Knöllchengewebe völlig unzureichend, so daß nicht genug ATP produziert werden könnte. Aufgrund der Eigenschaften des Hämproteins kann ein starker O_2 -Fluß innerhalb des Gewebes aufrechterhalten werden.

Seitdem die in den vergangenen 30 Jahren durchgeführten Untersuchungen auf eine spezifische Rolle des Molybdäns bei der Stickstoffbindung von Rhizobiumarten und anderen stickstoffbindenden Organismen hinwiesen (BURRIS 1966), war es von großem Interesse, die Sojabohnenbakteroid-Nitrogenase zu fraktionieren und die Eigenschaften der einzelnen Fraktionen einschließlich der Metallgehalte festzustellen. Die Nitrogenase ist ein Multiprotein-Komplex, welcher nicht hämartig gebundenes Eisen, Molybdän und SH-Gruppen enthält. KLUCAS, KOCH, RUSSEL u. EVANS 1968 stellten mit ihren Untersuchungen zwei Proteinkomponenten in der Sojabohnenbakteroid-Nitrogenase fest. Fraktion I enthielt beträchtliche Mengen Nichtäm-Eisen und Molybdän, in Fraktion II befand sich nur Nichtäm-Eisen. Die einzeln gemessenen spezifischen Aktivitäten für die N_2 -Bindung von Fraktion I und II betrugen 0,0 bzw. 5,6 eine Kombination gleicher Mengen beider Fraktionen ergab jedoch eine spezifische Aktivität von 72,5 nmol N_2 pro mg Protein und pro Minute, wie aus Tabelle 37 zu entnehmen ist.

Tabelle 37 Spezifische Aktivität der beiden Protein-
Komponenten der Sojabohnenbakteroid-Nitrogenase
(KLUCAS et al. 1968)

Enzym- präparat	Nitrogenase	Fe	Mo
	nmol N ₂ /mg Protein/min	nmol/mg Protein	nmol/mg Protein
Rohextrakt	9,2	8	1,1
Fraktion I	0,0	44	2,2
Fraktion II	5,6	50	1,0
Fraktion I u. II	72,5	-	-

Die Katalyse der N₂-Reduktion von Extrakten aus N₂-fixierenden Organismen benötigt ein ATP-erzeugendes System und eine Elektronenquelle (BULEN, BURNS u. LECOMTE 1965; MORTENSON 1964). Die Phosphorylierungsreaktion sorgt für beides, für ATP und für die Elektronen, die für die Reduzierung des Stickstoffs notwendig sind (MORTENSON 1964; D'EUSTACHIO u. HARDY 1964). Ferredoxin funktioniert hierbei als natürlicher Elektronenüberträger von der Elektronentransportkette zur Nitrogenase (MORTENSON 1964). D'EUSTACHIO u. HARDY (1964) berichten, daß Borhydrid, Wasserstoff, NADH oder NADPH in Gegenwart von Ferredoxin als reduzierende Mittel bei der N₂-Fixierung im Clostridiumsystem fungieren. Zellfreie Extrakte von Acetobacter vinelandii (BULEN, BURNS u. LECOMTE 1965) und Bakterioide von Sojabohnenkünlchen (KOCH, EVANS u. RUSSEL 1967) katalysieren ebenfalls die Reduktion von N₂ zu NH₃, hierbei muß jedoch das Reduktionsmittel als auch ATP zugesetzt werden. Im intakten System werden ATP als auch die Reduktionsmittel (z.B. reduzierend wirkende Elektronen) vom Elektronentransport einer Atmungs-

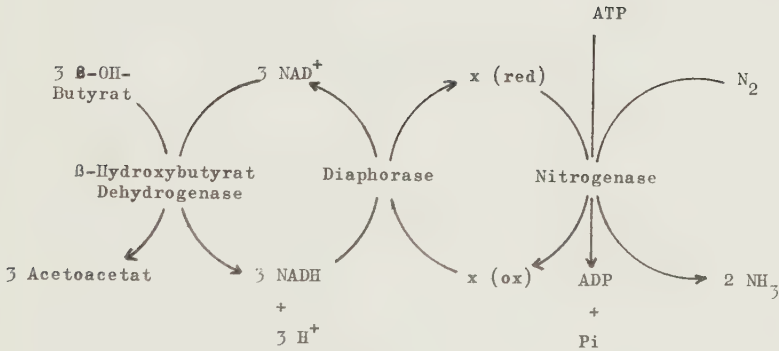
kette zur Verfügung gestellt. Das gilt für Leguminosenknöllchen und auch für Acetobacter. Untersuchungen von KLUCAS u. EVANS (1968) an Sojabohnenextrakten legen dar, daß für die Reduktion von Äzethylen zu Äthylen ein ATP-erzeugendes System sowie ein reduzierendes System notwendig sind (Tabelle 38). Das reduzierende System wird entsprechend nachstehender Abb. 11 von β -Hydroxybutyrat gespeist. Seine Oxydation bewirkt eine Reduktion von NAD^+ zu NADH, welches wiederum mit Hilfe einer Diaphorase ein noch unbekanntes Redoxsystem (x) mit Elektronen oder H-Atomen beliefert. Dieses System ist mit der Nitrogenase gekoppelt. Der so bewirkte Elektronen- oder H-Transfer bewirkt in Zusammenarbeit mit ATP die Reduktion von N_2 zu NH_3 (Abb. 11). ATP wird hierbei in ATP und anorganisches Phosphat gespalten.

Tabelle 38 Azethylenreduktion des Bakteroidsystems
von KLUCAS u. EVANS 1968

	C_2H_4 Produktion
	nmol / 20 min
komplett	268
ohne ATP-System	0
ohne Benzylviologen	0
ohne NADH	21
ohne β -hydroxybutyrat	64

KLUCAS u. EVANS (1968) stellten bei ihren Untersuchungen an Sojabohnenextrakten fest, daß bei der Azethylenreduktion ein Vorgang, der analog der N_2 -Reduktion verläuft, ein ATP-erzeugendes System, ein reduzierendes System, β -hydroxybutyrat, NADH und Benzylviologen notwendig sind.

Abb. 11



Wie schon erwähnt, enthalten die Bakterioide eine große Menge an β -Hydroxybutyratdehydrogenase. Eine NADH-Dehydrogenase (Diaphorase) wurde im Extrakt von Sojabohnenknöllchenbakteroiden identifiziert. Ein natürlicher Träger anstelle von x in dem Schema 11 ist bis heute nicht bekannt, aber Benzyl- oder Methylviologen können diesen natürlichen Überträger wirksam ersetzen. Der natürliche Überträger könnte ein Redoxpotential ähnlich wie Flavodoxin (- 0,28 Volt) haben, das aus *Clostridium pasteurianum* isoliert wurde (KNIGHT u. HARDY 1967).

In Abb. 13 wird das Schema der zentralen Vorgänge der N₂-bindung wiedergegeben (BERGERSEN 1971). Aus ihm ist zu entnehmen, daß Bakterioide von Sojabohnenknöllchen verschiedene Pigmente, wie P-450, P-428, P-420 und auch Cytochrom C enthalten, die beim Elektronentransport mitwirken. Aufgrund der

verringerten Sauerstoffaufnahme von Bakteroidsuspensionen während der N_2 -Fixierung wird vermutet, daß zwei Zweige des Elektronentransportsystems miteinander konkurrieren, wobei der eine in einer Oxydase und der andere in einer Nitrogenase endet. KLUCAS u. EVANS 1968 nehmen an, daß die Abzweigung unmittelbar hinter der NAD-Reduktase (Diaphorase) erfolgt.

Das Elektronentransportsystem, das die Elektronen in die Nitrogenase führt, gibt diese an die Proteinkomponenten der Nitrogenase ab (Fraktion I mit MG 180.000 enthält Fe und Mo und Fraktion II mit MG 50.000 enthält nur Fe). Das andere Elektronentransportsystem, das in der Oxydase endet, sorgt durch oxydative Phosphorylierung für das benötigte ATP. Hierbei stellt das Leghämoglobin den nötigen Sauerstoff zur Verfügung. Der molekulare Stickstoff diffundiert bis in die Nitrogenase. Diese reduziert ihn mit Hilfe der vorhandenen Elektronen bzw. H^+ bis zu NH_3 . Einzelheiten und Zwischenstufen dieses Vorganges sind nicht genau bekannt. Man nimmt jedoch an, daß nachstehendes Schema im Prinzip gültig ist:

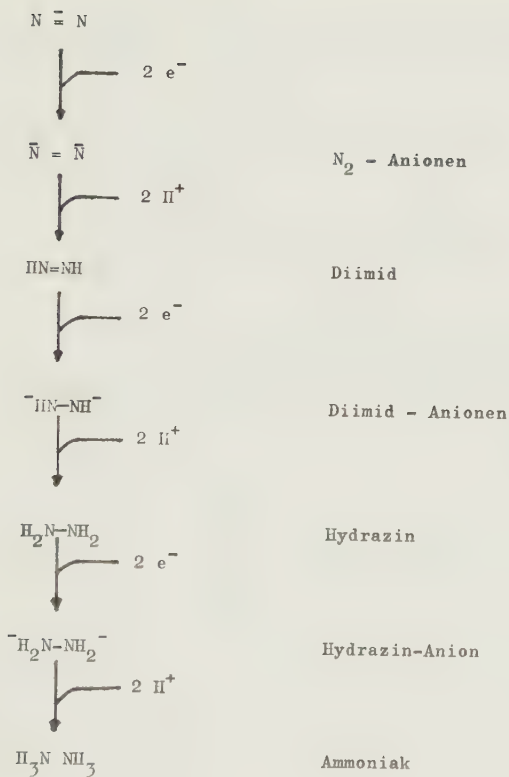
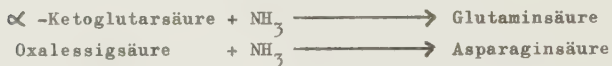


Abb. 12

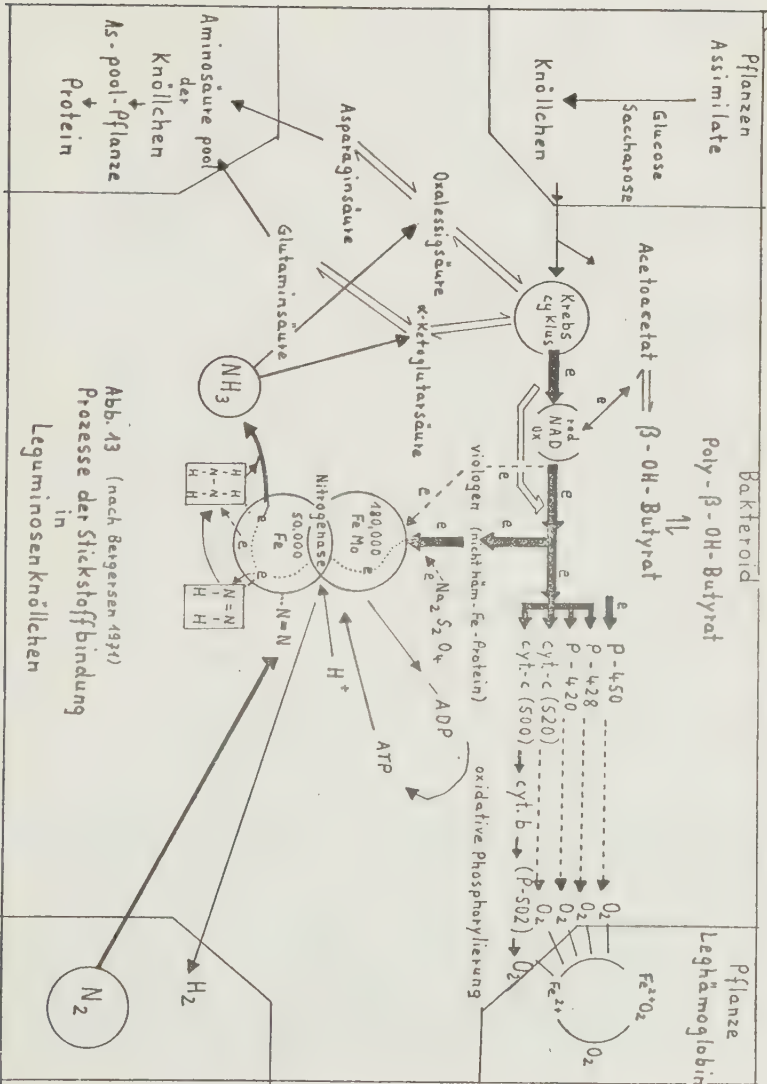
Schematische Darstellung der mikrobiologischen
 N_2 - Reduktion (ABEL 1963)

Das entstehende NH_3 bildet mit Ketosäuren, α -Ketoglutarsäure oder Oxalessigsäure Reaktionsprodukte des Krebszyklus, über reduktive Aminierung Aminosäuren.



Die so in den Knöllchen gebildeten Aminosäuren werden in die Pflanze transportiert, wo sie als Bausteine für die Proteinbildung fungieren.

Nach Ansicht von BERGERSEN sind Abänderungen an dem Schema 13 entsprechend dem Fortschritt der Forschung nicht ausgeschlossen. Weitere Entwicklungen können auf dem Gebiet des Bakteroidstoffwechsels und des Elektronentransportes eintreten.



Diskussion

Die Frage, inwieweit durch erhöhte K-Applikation das N_2 - Fixierungsvermögen der Knöllchenbakterien und der damit verknüpfte Stickstoffhaushalt der Pflanze beeinflusst werden kann, wurde in dieser Arbeit untersucht. Die experimentell ermittelten Daten zeigen, daß eine erhöhte Kaliumdüngung den Ertrag der untersuchten Pflanzen steigerte (Tabelle 4,6,7,8,9,10). Dies ist auf die Wirkung des Kaliums zurückzuführen. Es ist bekannt, daß das Kalium an der Aktivierung zahlreicher enzymatischer Prozesse beteiligt ist und daß der Energiestatus der Pflanze bei optimaler K-Versorgung gut ist. Die erhöhte Kaliumgabe hatte eine bessere Bildung der Knöllchen zur Folge (Tabelle 4,6,9,10), die ihrerseits für die Anlieferung des Stickstoffs an die Pflanzen verantwortlich sind. Hierbei wurde sowohl die Knöllchenanzahl als auch das Knöllchengewicht durch gesteigerte K-Düngung erhöht. APRISON, MAGEE u.BURRIS (1954) hatten bei ihrer Untersuchung an Sojabohnen Knöllchen mit ^{15}N festgestellt, daß die größeren Knöllchen den Luftstickstoff viel aktiver fixieren als die kleineren. Dasselbe wurde auch von CHEN u.THORNTON (1940) gefunden.

Der Einfluß der K-Applikation auf den Gehalt an löslichen Aminoverbindungen in Leguminosen unterscheidet sich von dem Einfluß auf Nichtleguminosen. Viele Untersuchungen an Nichtleguminosen zeigen, daß der Gehalt an freien Aminosäuren mit verbesserter Kaliumversorgung abnimmt (MENGEL u.HEHAL 1968; HEHAL u.MENGEL 1968). Bei Leguminosen dagegen nimmt der Gehalt an löslichen Aminosäuren mit verbesserter Kaliumdüngung zu. Der geringere Gehalt an löslichen Aminoverbindungen in den Nichtleguminosen bei guter Kaliumversorgung erklärt sich mit einem schnelleren Einbau von Aminosäuren in die Proteinfraktion, wie Untersuchungen von KOCH u.MENGEL (1972) an Tabak mit markiertem N deutlich zeigen. Wenn bei den Leguminosen ein gegen-

teiliger Effekt einer reichlichen Ernährung mit Kalium gefunden wurde, so gibt das Anlaß zur Vermutung, daß Kalium hier auch den Transfer von N_2 in die lösliche Aminofraktion, also die N_2 Fixierung, begünstigt. Kalium wirkt also hier wie eine N-Düngung bei Nichtleguminosen. Diese Aussage deckt sich mit Befunden von KOCH u.MENGEL (1972) an *Trifolium pratense*. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß mit verbesserter Kaliumernährung nicht immer der Gesamtgehalt an löslichen Aminoverbindungen erhöht wurde. Aber es fällt auf, daß die Gehalte an Glutaminsäure und Asparaginsäure in den meisten Fällen mit der erhöhten K-Versorgung gesteigert wurden (Tabelle 11, 13, 15, 17, 20). Diese beiden Aminosäuren werden als wichtigste Indikatoren des Stickstoffernährungszustandes bezeichnet, und zwar deutet ein höherer Gehalt an Glutaminsäure und Asparaginsäure immer auf eine gute N-Versorgung der Pflanze hin, weil diese Aminosäuren durch direkte Aminierung gebildet werden. Der Gehalt an Asparagin bei dem untersuchten Rotklee und Luzerne nahm von K_1 nach K_3 hin mit verbesserter K-Düngung ab. Hier darf vermutet werden, daß bei unzureichender K-Versorgung in der K_1 -Variante es zu einer zu geringen Anlieferung von Ketosäuren aus dem Krebszyklus gekommen ist, so daß NH_3 vermehrt von Asparaginsäure unter Bildung des Säureamids abgefangen werden mußte.



Bei den Untersuchungen an Ackerbohnen war die umgekehrte Tendenz zu beobachten, d.h. der Gehalt an Asparagin stieg mit erhöhter K-Düngung in den oberirdischen Pflanzenteilen an (Tabelle 11).

Gut mit Kalium ernährte Pflanzen zeigen einen verbesserten Assimilattransport aus den Blättern in die Wurzel. Dieser Befund wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren beschrieben (HAEDER u.MENGEL 1972, VIRO 1973, HAEDER, MENGEL u. FORSTER i.Druck). Die genannten Untersuchungen wurden zwar

nicht an Leguminosen durchgeführt, aber es darf angenommen werden, daß auch für diese prinzipiell eine Begünstigung des Assimilattransportes durch Kalium zutrifft. Die eigenen mit $^{14}\text{CO}_2$ durchgeführten, in Tabelle 29 dargelegten Daten bestätigen diese Annahme. Es zeigt sich nämlich, daß mit verbesserter Kaliumversorgung der Gehalt an ^{14}C markierten Verbindungen der Knöllchen erhöht ist. Die günstige Wirkung des Kaliums auf die N_2 -Fixierung ließe sich also damit erklären, daß den Knöllchenbakterien vermehrt Assimilate zur Verfügung stehen. Diese Erklärung ist aber nicht ganz befriedigend, denn wie der Tabelle 29 zu entnehmen ist, hatte die verbesserte K-Versorgung einen wesentlich deutlicheren Einfluß auf die ^{14}C -Markierung in der Aminosäurefraktion als auf die Markierung in der Zuckerfraktion. Das besagt, daß bei gutem K-Ernährungszustand mehr reduzierter Stickstoff (NH_3) den Assimilaten zur Verfügung stand. Die durch Kalium begünstigte Fixierung von N_2 kann also primär nicht auf die bessere Verfügbarkeit der Assimilate zurückgeführt werden; sie muß vielmehr die Bereitstellung von reduziertem Stickstoff begünstigt haben. Die Daten der Tabelle 29 zeigen deutlich, daß mit einer höheren Verfügbarkeit von reduziertem Stickstoff die Assimilate verstärkt für den Aufbau von organischen N-Verbindungen verbraucht werden. Dieser Befund deckt sich mit Untersuchungen an Nichtleguminosen, sowie Leguminosen. Von anderen Autoren, die ebenfalls feststellten, daß mit einer verbesserten N-Zufuhr die Assimilate in höherem Maße für die Bildung organischer N-Verbindungen verbraucht werden (BROWN u. BLASER 1965, HEHL 1971). Die in der Tabelle 29 aufgeführten Impulsraten zeigen weiterhin, daß in den meisten Fällen in der Aminosäurefraktion mehr markierter ^{14}C vorlag als in der Zuckerfraktion. Diese Unterschiedlichkeit wird besonders im Versuch 2 deutlich. Bei geringer K-Versorgung war hier der Gehalt an markiertem ^{14}C in der

Aminosäurefraktion niedriger als der Gehalt an ^{14}C in der Zuckerfraktion. Bei hoher K-Versorgung (K_3) jedoch war der ^{14}C -Gehalt der Aminosäurefraktion fast doppelt so hoch, wie der ^{14}C -Gehalt der Zuckerfraktion. Dieses Ergebnis spricht deutlich für den günstigen Einfluß des Kaliums auf den Umbau von Assimilaten in der organischen Stickstoff-Fraktion.

Die Untersuchungen mit ^{15}N -markiertem, gasförmigem Stickstoff liefern schließlich den letzten Beweis dafür, daß Kalium die Bindung des molekularen Stickstoffs begünstigt. So zeigt Tabelle 30, daß der Gehalt an ^{15}N in der löslichen Aminosäurefraktion durch Kalium deutlich erhöht wurde. Eine analoge Erhöhung an ^{15}N findet sich auch in der Proteinfraction (Tabelle 31). Die bessere Kaliumversorgung bewirkte also einen erhöhten Umsatz von molekularem Stickstoff über die lösliche Aminosäure bis hin zu den Proteinen. Ob der günstige Einfluß des Kaliums auf die Proteinsynthese nur auf eine erhöhte Anlieferung löslicher Aminosäuren zurückzuführen ist, sei dahingestellt. Es ist nämlich aus Untersuchungen von LUBIN (1963) sowie KLOPPSTECH u.KLINK (1967) bekannt, daß die Proteinsynthese Kalium benötigt. In Übereinstimmung mit diesen Befunden fanden MENGEL u.KOCH (1971) an Sonnenblumen und KOCH u.MENGEL (1972) an Tabak, daß ein guter Kaliumernährungszustand die Proteinbildung begünstigt. Hier darf abschließend festgestellt werden, daß bei den Leguminosen Kalium auch über die Bereitstellung von reduziertem Luftstickstoff die Stickstoffernährung der Leguminosenpflanze und damit ihre Ertragsbildung begünstigt. Dieser günstige Einfluß wird besonders deutlich, wenn man die Gesamtstickstoffmengen einer Pflanze bei unterschiedlicher Kaliumversorgung vergleicht (Tabelle 32). Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die besser mit Kalium versorgten Pflanzen 40 - 90% mehr an Luftstickstoff zu assimilieren vermochten, als die Pflanzen der K_1 -Variante. Die Frage, wo das Kalium in das physiologische Geschehen der N_2 -

Fixierung direkt eingreift, ist anhand dieser Untersuchungen nicht geklärt. Es gibt auch keine Anhaltspunkte über den Einfluß des K-Ions auf die Nitrogenase.

Viele Autoren (LINDSTROM, NEWTON u. WILSON 1952) und BOND (1956) berichten, daß die Photosyntheserate die Höhe der N_2 -Fixierung bestimmt. Dieser Befund ist nicht zu bestreiten, da die Kohlenhydrate einerseits die C-Skelette und andererseits Energie für den Haushalt der Pflanzen liefern. Die Untersuchungsergebnisse mit markiertem $^{14}CO_2$ (Tabelle 29) zeigen jedoch, daß die Synthese der Aminosäuren durch gesteigerte K-Applikation gefördert wird. Wenn nun die Assimilationsintensität allein die Höhe der N_2 -Fixierung bestimmte, dann müßte die Steigerung in den beiden Fraktionen etwa parallel verlaufen. Da es nicht so ist, kann man daraus schließen, daß das K-Ion an irgendeiner Stelle mehr direkt die N_2 -Fixierung beeinflusst. PFLÜGER u. MENGEL (1972) stellten mit ihren Untersuchungen an isolierten Chloroplasten aus Spinat- und Ackerbohnenblättern fest, daß die gut mit Kalium ernährten Pflanzen höhere Photoreduktions- und Photophosphorylierungsraten zeigen, als schlecht mit Kalium ernährte Pflanzen, d.h. die ATP-Synthese wurde bei gut mit Kalium ernährten Pflanzen beschleunigt.

Es ist bekannt, daß der Prozeß der N_2 -Fixierung ein stark endergonischer Vorgang ist und ein ATP-bildendes System die Intensität der N_2 -Bindung stark positiv beeinflusst. So sind für die Reduktion von einem Molekül N_2 32 Moleküle ATP notwendig. Es kann deshalb angenommen werden, daß Kalium über eine effizientere ATP-Synthese die N_2 -Bindung beeinflusst. Aus diesem Grunde wurde die Bildung organischer Phosphate in Knöllchen von Ackerbohnen in Abhängigkeit von der K-Ernährung zusätzlich untersucht. Auch mit markiertem ^{32}P ist es außerordentlich schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, die ATP-Syntheserate zu bestimmen; denn das gebildete ATP wird immer wieder in ADP und

anorganisches Phosphat aufgespalten. Diese Aufspaltung verläuft um so schneller, je mehr ATP für die N_2 -Fixierung benötigt wird. Neben dem Verbrauch von ATP für die Reduktion von N_2 wird auch ATP für die Synthese von Nukleinsäuren verbraucht. In diesem Falle wird also anorganisches Phosphat in die organische Phosphatform der Nukleinsäure überführt. Da, wie oben dargelegt, die ATP-Umsatzrate nicht zu erfassen ist, sollte zumindest überprüft werden, ob mit verbesserter K-Ernährung nicht vermehrt markiertes ^{32}P in die organische Form überführt wird. Falls das der Fall ist, könnte man indirekt auf eine bessere ATP-Verfügbarkeit schließen. Umgekehrt ist jedoch ein in Abhängigkeit von dem K-Ernährungszustand unveränderter oder geringerer Transfer von anorganischem ^{32}P in die organische Form noch kein Beweis dafür, daß für die N_2 -Fixierung weniger ATP zur Verfügung stand.

Für die Untersuchungen mit markiertem P wurden Ackerbohnen gewählt, die 3 Wochen - wie am Anfang beschrieben - in Wasserkultur angezogen wurden. Es wurden 2 Serienversuche durchgeführt. In der ersten Serie wurden die Pflanzen zwei Stunden mit radioaktivem Phosphat (P^{32}) behandelt (Tabelle 37). In der zweiten Serie wurden die Knöllchen von der Wurzel abgetrennt und dann in radioaktivem Phosphat inkubiert. Hierbei wurde die Behandlungsdauer variiert (Tabelle 38). Die Konzentration des radioaktiven ^{32}P in der Nährlösung betrug bei Versuch 1-3 (Tabelle 39) und bei Versuch 1 (Tabelle 40) 6,7 μ ci, bei Versuch 4-6 (Tabelle 39) und bei Versuch 2-5 (Tabelle 40) 20 μ ci. Zur Bestimmung des radioaktiven Phosphats wurde die Methode von AVRON (1960) variiert angewandt:

1 g Knöllchen (Frischgewicht) wurde unter laufender Zugabe von flüssigem N_2 zermörsert, mit 7 ml 0,9 M $HClO_4$ (eiskalt) versetzt und 2 min. feinst vermischt, anschließend hochtourig abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 N KOH neutralisiert und 10 min. in ein Eisbad gestellt. Das

ausgefallene $KClO_4$ wurde abzentrifugiert. In dem so bereiteten Extrakt wurde die organische P-Fraktion bestimmt.

Zu dieser Bestimmung waren folgende Reagenzien notwendig:

Lösung	a)	5	ml	5	m	H_2SO_4
		5	ml	10%		Ammoniummolybdat
		28	ml			H_2O
Lösung	b)	Wassergesättigtes Iso-Butanol-Benzol				
		(1 : 1 v)				

Lösung a wurde mit Lösung b gesättigt. Von der fertigen Lösung wurde 3,8 ml in ein Reagenzglas gegeben und mit 0,2 ml Extrakt versetzt. Von dieser Mischung wurden 0,6 ml für die Bestimmung von Gesamt ^{32}P entnommen. Der Rest wurde mit 10 ml wassergesättigtem Iso-Butanol-Benzol + 5/ul 0,1 m Na_2HPO_4 (als Trägerphosphat) 15 sec. kräftig geschüttelt. Der anorganische Phosphor fiel als Phosphatmolybdatkomplex aus, und wurde aus der wässrigen Phase entfernt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Beim zweiten Male war kein Trägerphosphat zugegen. 0,2 ml der Gesamt ^{32}P -Probe und 0,2 ml der organischen ^{32}P -Probe wurden im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Es wurden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt. Als Standardlösung dienten 0,2 ml der markierten Nährlösung, in der die PO_4 -Menge bekannt war.

Die Untersuchungsdaten in den Tabellen 39-40 zeigen, daß der Gehalt an gesamten markierten ^{32}P und auch der Gehalt an organischem markierten ^{32}P bei allen Versuchen - außer bei Versuch 1 in Tabelle 39 - durch erhöhte Kaliumgaben abnimmt. Die prozentuale Menge an markiertem Phosphat, die in die organische Phosphatform umgesetzt wurde, blieb konstant.

Es muß noch betont werden, daß das Alter der Knöllchen und

ihre Entwicklungsphase zu berücksichtigen sind. Während bei diesen Versuchen die Knöllchen von den besser mit Kalium ernährten Pflanzen zum Erntezeitpunkt voll ausgewachsen waren, hatten sich die Knöllchen bei den Pflanzen der K_1 -Variante langsamer entwickelt. Es ist auch nicht möglich, gleichgroße und gleichaltrige Knöllchen mit gleicher Effektivität auszulesen.

Der höhere Gehalt an organischem markierten Phosphat in der K_1 -Variante kann nicht auf die ATP Menge bezogen werden, sondern vielmehr auf das organische Phosphat, das bei der Nukleinsäuresynthese für den Knöllchenaufbau bei der meristematischen Zellteilung gebraucht wurde.

Tabelle 39-40 zeigt, daß die Gesamtaufnahme des markierten Phosphates in den Knöllchen der K_1 -Variante größer ist, als in denen der K_3 -Variante.

Wie groß der Gehalt an markiertem Phosphat im Sproß ist, wurde bei dieser Versuchsanstellung nicht untersucht. Man kann schlecht annehmen, daß die größeren Pflanzen weniger Phosphat aufgenommen haben als die kleineren. Da besser mit Kalium versorgte Pflanzen schneller wachsen, ist anzunehmen, daß hier das aufgenommene Phosphat vermehrt in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert wurde; denn es ist bekannt, daß die Nährstoffe immer zu den Organen transportiert werden, in denen am meisten Bedarf besteht.

Die mit markiertem Phosphat durchgeführten Untersuchungen geben zwar keinen direkten Hinweis auf den Einfluß des Kaliums auf die ATP-Bildung. Indirekt läßt sich jedoch schließen, daß mit einer erhöhten Rate von fixiertem Stickstoff auch mehr ATP zur Verfügung stehen muß. Nach MAHLER u. CORDES (1968) werden für die Reduktion von einem mol N_2 225 KCal benötigt. Das entspricht etwa 32 ATP-Molekülen. Hieraus wird deutlich, daß die Reduktion von N_2 zu NH_3 eine beachtliche Menge Energie benötigt. Wenn sich

bei besserem K-Ernährungszustand der Wirtspflanze die Reduktionsrate von N_2 erhöhte, so spricht auch das dafür, daß in diesem Falle dem System mehr ATP zur Verfügung stand.

Tabelle 39

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Aufnahme
und Assimilation von P^{32} innerhalb von 2 Stunden bei
Knöllchen von Ackerbohnen

mg P/g Frischknöllchen

<u>Versuch I</u>			<u>Versuch II</u>		<u>Versuch III</u>	
Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form		Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form	Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form
K ₁ 3,85 (100)	3,55 (92)		6,11 (100)	4,84 (79)	5,95 (100)	4,84 (81)
K ₂ 4,14 (100)	3,61 (87)		5,40 (100)	4,34 (80)	5,38 (100)	4,45 (83)
K ₃ 7,82 (100)	6,93 (89)		3,40 (100)	2,86 (83)	4,77 (100)	3,96 (83)

<u>Versuch IV</u>			<u>Versuch V</u>		<u>Versuch VI</u>	
Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form		Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form	Gesamt P^{32}	P^{32} in org. Form
K ₁ 9,44 (100)	7,92 (84)		7,27 (100)	6,40 (88)	6,41 (100)	5,6 (87)
K ₂ 5,98 (100)	5,05 (84)		4,82 (100)	4,17 (87)	10,11 (100)	9,30 (93)
K ₃ 6,86 (100)	5,96 (87)		6,71 (100)	5,94 (88)	7,21 (100)	6,13 (85)

Tabelle 40

Der Einfluß einer gesteigerten K-Düngung auf die Aufnahme
und Assimilation des markierten Phosphors (^{32}P) bei
Knöllchen von Ackerbohnen

mg P/g Frischknöllchen

<u>Versuch I</u>			<u>Versuch II</u>		<u>Versuch III</u>	
Gesamt P^{32}	P^{32} in org.Form		Gesamt P^{32}	P^{32} in org.Form	Gesamt P^{32}	P^{32} in org.Form
Applikationsdauer 2 Stunden			Applikationsdauer 30 min		Applikationsdauer 30 min	
K ₁	3,16 (100)	3,07 (97)	10,92 (100)	9,16 (84)	14,06 (100)	11,89 (85)
K ₂	2,71 (100)	2,68 (99)	10,06 (100)	8,40 (84)	9,98 (100)	8,80 (88)
K ₃	2,86 (100)	Ausfall d. Analysen- fehler	9,48 (100)	7,56 (80)	10,32 (100)	8,74 (85)

<u>Versuch IV</u>			<u>Versuch V</u>	
Gesamt P^{32}	P^{32} in org.Form		Gesamt P^{32}	P^{32} in org.Form
Applikationsdauer 30 min			Applikationsdauer 15 min	
K ₁	11,69 (100)	10,38 (89)	6,10 (100)	5,06 (83)
K ₂	8,15 (100)	6,85 (84)	5,07 (100)	4,18 (82)
K ₃	10,74 (100)	8,99 (84)	5,51 (100)	4,55 (83)

VI. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß einer variierten K-Ernährung auf die N_2 -Fixierung bei verschiedenen Leguminosen - Ackerbohnen (*Vicia faba*), Rotklee (*Trifolium pratense*) und Luzerne (*Medicago sativa*) - untersucht. Die Versuchsdaten zeigen:

- 1) Der Ertrag der untersuchten Pflanzen stieg mit verbesserter K-Düngung an.
- 2) Während der Gesamtgehalt an löslichen Aminoverbindungen in den meisten Fällen durch eine bessere K-Applikation erhöht wurde, stiegen die Gehalte an Glutaminsäure und Asparaginsäure in allen Fällen an. Es wird vermutet, daß eine gesteigerte K-Düngung den Transfer des molekularen Stickstoffs zu den Aminosäuren begünstigt.
- 3) Der Proteingehalt der untersuchten Pflanzen blieb in den meisten Fällen durch eine variierte K-Düngung konstant; dies ist auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen. Die Proteinерträge stiegen hingegen mit einer verbesserten Kaliumdüngung an.
- 4) Untersuchungen, bei denen die oberirdischen Pflanzenteile mit ^{14}C -markiertem CO_2 behandelt wurden, zeigen, daß bei der besseren K-Ernährung höhere Gehalte an ^{14}C -markierten Kohlenhydraten und organischen N-Verbindungen in den Knöllchen gefunden wurden. Interessanterweise hat hierbei die bessere K-Versorgung den Gehalt an ^{14}C -markierten organischen N-Verbindungen wesentlich stärker beeinflußt, als den Gehalt an ^{14}C -markierten Kohlenhydraten. Bei besserer K-Ernährung stand der Aminosäurebildung also eine vermehrte Menge an reduziertem Stickstoff zur Verfügung.
- 5) Die Versuche an *Vicia faba* mit ^{15}N -markiertem Luftstickstoff lassen klar erkennen, daß mit verbesserter K-Ernährung der Wirtspflanze der Einbau von Luftstickstoff in die Aminosäure-

fraktion und auch der Transfer von löslichem markiertem organischem Stickstoff in die Proteinfraction erhöht sind. Demnach hat das Kalium bei der Fixierung von molekularem Luftstickstoff durch Rhizobium eine spezifische Funktion. Sie läßt sich nicht nur damit erklären, daß der Assimilattransport aus den oberirdischen Pflanzenteilen in die Knöllchen durch Kalium begünstigt wird. Die verstärkte Verfügbarkeit von reduziertem Stickstoff bei gutem K-Ernährungszustand deutet vielmehr daraufhin, daß Kalium mehr direkt in den Reduktionsvorgang verwickelt ist.

- 6) Es wird vermutet, daß Kalium über eine erhöhte Rate der ATP-Synthese die Reduktion von N_2 zu NH_3 fördert; denn diese Reduktion ist ein endergonischer Vorgang, der viel ATP benötigt. Orientierende diesbezügliche Untersuchungen mit markiertem Phosphat gaben auf diese Frage jedoch keine eindeutige Antwort.

VII. Literatur

- ABEL, K.: The physical and chemical basis of symbiotic nitrogen fixation: Recent advances.
Photochemistry 2, 429 (1963)
- ALLEN, E.K. and O.N. ALLEN: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation.
Encyclopedia of Plant Physiol. Vo. VIII, p.48-118. Ed. W. Ruhland, Springer-Verlag (1958)
- ALLISON, F.E. and C.A. Ludwig: Legume nodule development in relation to available energy supply.
J. Amer. Soc. Agron. 31, 149-158 (1939)
- ALLOS, H.F. and W.V. BARTHOLOMEW: Effect of available nitrogen on symbiotic fixation.
Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 19, 182-184 (1955)
- ALLOS, H.F. and W.V. BARTHOLOMEW: Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen.
Soil Sci. 87, 61-65 (1959)
- ANDERSON, A.J.: Molybdenum deficiencies in legumes in Australia.
Soil Sci. 81, 173-258 (1956 a)
- ANDERSON, A.J.: Molybdenum as a fertilizer.
Adv. agron. 8, 163-202 (1956 b)
- ANDERSON, A.J. and M.P. THOMAS: Plant responses to molybdenum as a fertilizer. I. Molybdenum and symbiotic nitrogen fixation.
Bull. coun. sci. ind. Res. 198, 7-24 (1946)
- ANDERSON, A.J. and D.A. SPENCER: Lime in relation to clover nodulation at sites on the southern tableland of New South Wales.
J. Aust. Inst. Agric. Sci. 14, 39-41 (1948)
- APRISON, M.H., W.E. MAGEE and R.H. BURRIS: Nitrogen fixation by excised soybean root nodules.
J. Biol. Chem. 208, 29-39 (1954)
- AVRON, M.: Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 40, 257-272 (1960)
- BACH, M.K., W.E. MAGEE and R.H. BURRIS: Translocation of photosynthetic products to soybean nodules and their role in nitrogen fixation.
Plant Physiol. 33, 118-123 (1958)
- BAUER, N.: A probable free-radical mechanism for symbiotic nitrogen fixation.
Nature 188, 471-473 (1960)

- BERGERSEN, F.J.: The bacterial component of soybean root nodules; change in respiratory activity, cell dry weight and nucleic acid content with increasing nodules age. *J.Gen.Microbiol.* 19, 312-323 (1958)
- BERGERSEN, F.J.: Biochemical pathways in legume root nodule nitrogen fixation. *Bact. Rev.* 24, 246-250 (1960)
- BERGERSEN, F.J.: The effects of partial pressure of oxygen upon respiration and N_2 -fixation by soybean root nodules. *J.Gen.Microbiol.* 29, 113-125 (1962)
- BERGERSEN, F.J.: The relationship between hydrogen evolution, hydrogen exchange, nitrogen fixation and applied oxygen tensions in soybean root nodules. *Aust.J.Biol.Sci.* 16, 669-680 (1963)
- BERGERSEN, F.J.: Nitrogen fixation in breis of soybean root nodules. *Biochim.Biophys.Acta* 115, 247-249 (1966)
- BERGERSEN, F.J.: Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 22, 121-138 (1971)
- BERGERSEN, F.J. and G.L. TURNER: Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim.Biophys.Acta*, 141, 507-515 (1967)
- BOND, G.: Some aspects of translocation in root nodules plants. *J. of Experimental Botany*, 7, 21, 367-394 (1956)
- BOND, G.: The root nodules of non-leguminous angiosperms. In: P.S. Nutman and B.Mosse, eds.: Symbiotic associations 13th Symposium, Soc.Gen.Microbiol.Cambridge, Univ.Press, London, 72-91 (1963)
- BRAITHWAITE, B.M., Annette JANE and F.G. SWAIN: Effect of insecticides on sodsown sub-clover. *J.Austr.Inst.Agr.Sci.* 24, 155-157 (1958)
- BRAUER, A.: Über den Einfluß der Düngung auf die Verdaulichkeit und den Futterwert von Wiesenheu *Landw.Forschung* 13, 201 (1960)
Zitat: MENGEL, K., "Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze", Gustav Fischer-Verlag Jena, 4.Aufl.1972
- BROWN, R.H. and R.E. BLASER: Relationship between reserve carbohydrate accumulation and growth rate in orchard grass (*Dactylus glomerata*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Crop Sci.* 2, 577-582 (1965)

- BÜRGIN-WOLFF, A.: Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien.
Ber.Schweiz.Bot.Ges. 69, 75-111 (1959)
- BULEN, W.A., R.C. BURNS and J.R. LECOMTE: Nitrogen fixation: Hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*.
Proc.Natl.Acad.Sci., 53, 532-539 (1965)
- BURRIS, R.H.: Nitrogen fixation.
Plant Biochemistry, Eds. J.Bonner and J.E. Varner, 961-979, Academic Press, New York (1965)
- BURRIS, R.H.: Biological nitrogen fixation.
Ann.Rev.Plant Physiol., 17, 153-183 (1966)
- BURRIS, R.H., W.E. MAGEE and M.K. BACH: The PN_2 and the PO_2 function for nitrogen fixation by excised soybean nodules.
Ann.Acad.Sci.Fenn. 60, 190-199 (1965)
- CARLYLE, R.E. and J.D. THORPE: Some effect of ammonium and sodium 2,4-dichlorophen-oxy-acetates on legumes and the rhizobium bacteria.
J.Amer.Soc.Agron. 39, 929-936 (1947)
- CHEN, H.K. and H.G. THORNTON: The structure of "ineffective" nodules and its influence on nitrogen fixation.
Proc.Roy.Soc. (Lond.) B 129, 208-229 (1940)
- D'EUSTACHIO, A.J. and R.W.F. HARDY: Reductants and electron transport in nitrogen fixation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 319-323 (1964)
- DIENER, Th.: Über die Bedingungen der Wurzelknöllchenbildung bei *Pisum sativum* L.
Phytopathol. Z. 16, 129-170 (1960)
- DIXON, R.O.D.: Hydrogenase in pea root nodule bacteroides.
Arch. Microbiol. 62, 272-283 (1968)
- DONALD, C.M.: The impact of cheap nitrogen.
J.Austr.Inst.Agric.Sci., 26, 319-338 (1960)
- FAUST, H.: Emissionsspektrometrische N-Isotopenanlage.
Isotopentechnik 1, 13 (1960)
- FAUST, H.: Zur Probenahme von Stickstoffverbindungen für die emissionsspektrometrische Isotopenanalyse des Stickstoffs.
Isotopenpraxis 2, 62-65 (1965)

- FAUST, H.: Optical spectroscopic techniques for ^{15}N assay.
Research coordination meeting on recent development
in the use of ^{15}N in soil-plant studies, Sofia,
Bulgaria (1969)
- FLETCHER, W.W.: Effect of hormone herbicides on the growth of
Rhizobium trifolii.
Nature (London) 177, 1244 (1956)
- FLETCHER, W.W., P.B. DICKENSON and J.C. RAYMOND: The effect of
certain hormone herbicides on the growth and nodulation
of *Trifolium repens sylvestre* in aseptic culture.
Phyton 7, 121-130 (1956)
- FLETCHER, W.W., P.B. DICKENSON, J.D. FORREST and J.C. RAYMOND:
The effect of soil applications of certain substituted phen-
oxyacetic and phenoxy-butyric acids on the growth and
nodulation of *Trifolium repens sylvestre*.
Phyton 9, 41-46 (1957)
- GIBSON, H.H. and P.S. NUTMAN: Studies on the physiology of nodule
formation 7. A reappraisal of the effect of preplanting.
Ann.Bot. 24, 420-433 (1960)
- GOODCHILD, D.J. and F.J. BERGERSEN: Electron microscopy of the
infection and subsequent development of soybean nodules
cells.
J.Bacteriol. 92, 204-213 (1966)
- HAEDER, H.E. and K. MENGEL: Translocation and respiration of
assimilates in tomato plants as influenced by K nutrition.
Zeitschr.f.Pflanzenernähr.u.Bodenkde. 131, H.2,
139-148 (1972)
- HAEDER, H.E., K. MENGEL and H. FORSTER: The effect of potassium on
translocation of photosynthates and yield pattern of potato
plants.
J.Sci.Food a.Agric. (in press)
- HEHL, G.: Der Einfluß der Ernährung und des physiologischen Alters auf
den Kohlenhydratgehalt sowie die einzelnen Kohlenhydrat-
fraktionen bei einigen Gramineen und Leguminosen.
Diss.Aus dem Bot.Institut der Justus-Liebig-Univ.(1971)
- HEILENZ et al.: Biochemisches Praktikum für Studenten der Land-
wirtschaft, Hauswirtschaft und Ernährungswissenschaften.
- HELAL, M. und K. MENGEL: Der Einfluß einer variierten N- und K-Er-
nährung auf den Gehalt an löslichen Aminoverbindungen
und auf die Ertragsbildung bei Sommerweizen.
Z.Pflanzenernähr.u.Bodenkde., 120, 89-98 (1968)

- HEWITT, E.I.: Some aspects of mineral nutrition of legumes.
In: Nutrition of the legumes (ed.Hallsworth) Butterworths
London, 15-42 (1958)
- HOCH, M. und H.W. WEISSER: Eine spektroskopische Mikromethode zur
Bestimmung von ^{15}N .
Helv. Chim.Acta 33, 2128 (1950)
- HOCH, G.E., K.C. SCHNEIDER and R.H. BURRIS: Hydrogen evolution and
exchange and conversion of NO_2 into N_2 by soybean root
nodules.
Biochim.Biophys.Acta 37, 273-279 (1960)
- JENSEN, H.L. and R.C. BETTY: Nitrogen fixation in legume plants.
3. The importance of molybdenum in symbiotic nitrogen
fixation.
Proc.Linnean.Soc. New South Wales 68, 1-8 (1943)
- JOHNSON, G.V., H.J. EVANS and T.M. CHING: Enzymes of the glyoxylate
cycle in Rhizobia and nodules of legumes.
Plant Physiol. 41, 1130 - 1336 (1966)
- JORDAN, D.C.: The bacteroides of the genus Rhizobium
Bacteriol.Rev. 26, 119-141 (1962)
- KEILIN, D. and J.D. SMITH: Haemoglobin and nitrogen fixation in the
root nodules of leguminous plants.
Nature 159, 692-694 (1947)
- KIDBY, D.K.: Activation of a plant invertase by inorganic phosphate.
Plant Physiol. 41, 1139-1144 (1966)
- KLOPPSTECHE, H. und F. KLINK: Zur Alkali-Ionenwirkung auf Reilreakt. ober
der ribosomalen Peptidsynthese.
Naturwissenschaften 54, 320 (1967)
- KLUCAS, R.V. and H.J. EVANS: An electron donar system for nitrogenase-
dependent acetylene reduction by extracts of soybean nodules.
Plant Physiology 43, 1458-1460 (1968)
- KLUCAS, R.V., B. KOCH, S.A. RUSSEL and H.J. EVANS: Purification and some
properties of nitrogenase from soybean nodules.
Plant Physiol. 42, 1906-1912 (1968)
- KNIGHT, E. Jr. and R.W.F. HARDY: Flavodoxin - chemical and biological
properties.
J.Biol.chem. 242, 1370 - 1374 (1967)
- KOCH, B., H.E. EVANS and S.A. RUSSEL: Reduction of acetylene and nitrogen
gas by breis and cell-free extracts of soybean root nodules.
Plant Physiol. 42, 466-468 (1967)

- KOCH, B., H.J. EVANS and S.A. RUSSEL: Properties of the nitrogenase system in cell-free extracts of bacteroides from soybean root nodules.
Proc.Natl.Acad.Sci.58, 1343-1350 (1967)
- KOCH, K.: Der Einfluß des Kaliumernährungszustandes der höheren Pflanzen auf die Assimilation von anorganischem Stickstoff.
Ber.Dtsch.Bot.Ges.84, H.10, 607-612 (1971)
- KOCH, K. und K. MENGEL: Der Einfluß einer variierten N- und K-Ernährung auf den Gehalt an löslichen Aminosäuren und auf die Ertragsbildung bei Zuckerrüben.
Landwirtschaftl.Forschung XXIII, H.4, 353-361 (1970)
- KOCH, K. and K. MENGEL: Effect of a varried potassium nutrition on the uptake and incorporation of labelled nitrate by young tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.)
J.Sci.Fd.Agric. 23, 1107-1112 (1972)
- KOCH, K. und K. MENGEL: Der Einfluß der Kaliumernährung auf den Gehalt und das Spektrum löslicher Aminoverbindungen in Rotklee (*Trifolium pratense* L.).
Z.Pflanzenernähr.u.Bodenkde., 131, H 2, 148-154 (1972)
- KUBO, H.: Über das Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen.
Acta Phytochim.(japan.) 11, 195-200 (1939)
- LINDSTROM, E.S., J.W. NEWTON and P.W. WILSON: The relationship between photosynthesis and nitrogen fixation.
Proc.Nat. Acad.Sci. US 38, 392-396 (1952)
- LJUNGGREN, H. and G.FÄHRÆUS: The role of polygalacturonase in roothair invasion by nodule bacteria.
J.Gen.Microbiol. 26, 521-528 (1961)
- LUBIN, M.: A priming reaction in protein synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 72, 345-348 (1963)
- MAC CONNELL, J.T. and G. BOND: A comparison of the effect of combined nitrogen on nodulation in nonlegumes and legumes.
Plant and Soil 8, 378-388 (1957b).
- MAHLER, H.R. and E.H. CORDES: Biological chemistry.
Harper and Row, London, 1968
- MARSCHNER, H. und W. SCHAFARCYK: Influx und Efflux von Natrium und Kalium bei Mais und Zuckerrübenpflanzen.
Z.Pflanzenernähr.u.Bodenkde. 118, 187-201 (1967)

- MARTIN, P.: Untersuchungen mit ^{15}N zur Wanderung von Stickstoff in der Pflanze.
Landw.Forschung 22, Sonderh. 23, 1, 70 (1969)
- MARTIN, P.: Wanderwege des N in Buschbohnenpflanzen beim Aufwärtstransport nach der Aufnahme durch die Wurzel.
Zeitschr.f.Pflanzenphysiol. 64/65, 206-220 (1970)
- MAC KEE, G.W.: Effect of shading and plant competition on seedling growth and nodulation in birdsfoot trefoil.
Pennsylvania State Univ.Coll.Agr.Bull.689, 35 (1962)
- MEIER, G.: Emissionsspektrometrische N-Isotopenanalyse,
Kernenergie 2, 903 (1960)
- MEIER, G. und G. MÜLLER: Zur emissionsspektrometrischen Isotopenanalyse des Stickstoffs mit photoelektrischer Registrierung.
Isotopenpraxis 1, 53-62 (1965)
- MENGEL, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze.
Gustav-Fischer-Verlag Jena, 4. Auflage 1972
- MENGEL, K.: Influx und Efflux bei der K-Aufnahme junger Gerstenwurzeln.
Z.Pflanzenernähr.Düngung u.Bodenkde. 106, 193-206 (1964)
- MENGEL, K.: Die K-Abgabe intakter Gerstenpflanzen an das Nährmedium.
Kali-Briefe 2/3 1965
- MENGEL, K. und M. HELAL: Der Einfluß einer variierten N- und K-Ernährung auf den Gehalt an löslichen Aminoverbindungen in der oberirdischen Pflanzenmasse von Hafer.
Z. Pflanzenernähr.u.Bodenkde., 120, H 1, 12-20 (1968)
- MENGEL, K. und K. KOCH: Der Einfluß einer variierten K-Ernährung auf die Inkorporierung von Stickstoff (^{15}N) bei jungen Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.).
Z. Pflanzenernähr.u.Bodenkde., 130, 224-233 (1971)
- MENGEL, K. and R. SIMIC: Effect of potassium supply on the acropetal transport of water, inorganic ions and amino acids in young decapitated sunflower plants (*Helianthus annuus*).
Physiol. Plant. 28, 232-236 (1973)
- MILTHORPE, F.L.: The compatibility of protectant seed dusts with root nodule bacteria.
J.Austral.Inst.Agr.Sci. 11, 89-92 (1945)
- MORTENSON, L.W.: Ferredoxin requirement for nitrogen fixation by extracts of *Clostridium pasteurianum*.
Biochim. Biophys. Acta 81, 473-478 (1965)

- MORTENSON, L.W.: Ferredoxin and ATP requirements for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*.
Proc.Nat.Acad.Sci. 52, 272-279 (1964)
- MUECKE, P.S. and J.T. WISKICH: Respiratory activity of mitochondria from legume root nodules.
Nature 221, 674-675 (1969)
- PATE, J.S.: Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis.
Nature (Lond.) 192, 637-639 (1961)
- PATE, J.S.: Nodulation studies in legumes. 5. The effect of temperature on symbiotic performances of bacterial associations of *Medicago tribuloides* desr. and *Vicia atropurpurea* desf.
Phyton 18, 65-74 (1962)
- PFLÜGER, R. und K. MENGEL: Die photochemische Aktivität von Chloroplasten aus unterschiedlich mit Kalium ernährten Pflanzen.
Plant and Soil 36, 417-425 (1972)
- POSCHENRIEDER, H. und W. LESCH : Untersuchungen über den Einfluß langjähriger einseitiger Düngungsmaßnahmen auf die Ausbildung und Nährstoffaufnahme der Wurzelknöllchen von Sojabohnen.
Bodenkunde und Pflanzenernährung 32, 1-16 (1943)
- RAGGIO, M. and N. RAGGIO: Root nodules.
Ann.Rev. Plant Physiol. 13, 109 (1962)
- RATNER, E.J. and O.J. YELISEOVA: Effect of source of potassium assimilated by plants on metabolism of nitrogenous substances in leaves in connection with organic acid metabolism.
Fisiol. Rastenij 15, 488-497 (1968)
- RICHARDSON, D.A., D.C. JORDAN and E.H. GARRARD: The influence of combined nitrogen on the nodulation and nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti* dangeard.
Canad. J. Plant Sci. 37, 205-214 (1957)
- RITTENBERG, D.: Separation and measurements of isotopic tracers.
Edwards Ann Arbor., Michigan (1948)
- ROBERTS, J.L. and F.R. OLSEN: The relative efficiency of strains of *Rhizobium trifolii* as influenced by soil fertility.
Science 95, 413-414 (1942)
- RUHLOFF, Marcia and J.C. BURTON: Compatability of Rhizobia with seed protectants.
Soil Sci. 72, 283-290 (1951)
- SCHEFFER, F., P. SCHACHTSCHABEL: Lehrbuch der Bodenkunde, 7. Aufl.(1970)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

- SCHOLANDER, P.F.: Oxygen transport through hemoglobin solutions.
How does presence of hemoglobin in a wet membrane mediate
an eightfold increase in oxygen passage.
Science 131, 585-590 (1960)
- SEEGER, J.R.: Effects d'une fumure azotée sur la nodulation et la
rendement de l'arachide.
Bull.Inst.Agron.Gembloux 29, 197-218 (1961)
- SPECTOR, W.S.: Handbook of biological data.
Sanders, Philadelphia and London (1956)
- THOMAS, W.H. and R.W. KRAUSS: Nitrogen metabolism in Scenedesmus as
affected by environmental changes.
Plant Physiol. 30, 113-122 (1955)
- THOMPSON, J.F. and C.J. MORRIS: The effect of potassium deficiency on
the amino acid composition of turnips.
Plant Physiol. 31, 9 (1956)
- THORNTON, H.G.: The present state of our ignorance concerning
the nodules of legumes plants.
Sci. Progr. 31, 236-249 (1936)
- van SCHREVEN, D.A.: Some factors effecting the uptake of nitrogen by
legumes.
In: "Nutrition of the legumes" (edd. Hallsworth),
Butterworths London, 137-163 (1958 a)
- van SCHREVEN, D.A.: Effects of added sugars and nitrogen on nodulation
of legumes.
Plant and Soil 11, 93-112 (1959)
- VIRO, M.: Der Einfluß einer variierten Ernährung mit Kalium auf die
Verlagerung von Assimilaten und Mineralstoffen bei Lycopersicon
esculentum.
Diss.Gießen 1973 Fachbereich 19 (Ernährungswissenschaften)
- VIRTANEN, A.J.: Symbiotic nitrogen fixation.
Nature 155, 747-748 (1945)
- VIRTANEN, A.J.: Some aspects of biological nitrogen fixation.
Ann.Acad.Sci.Fennicae Ser.A II, 43, 1-8 (1952)
- VIRTANEN, A.J. and T.LAINE: Red brown and green pigments in
leguminous root nodules.
Nature 157, 25-26 (1946)
- VIRTANEN, A.J., J. ERKAMA and H. LINKOLA: On the relation between
nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous
root nodules.
Act.Chem.Scand. 1, 861-870 (1947)

- VIRTANEN, A.J., A. KEMPPI and E. SALMENOJA: Reduction of hydroxylamin in the root nodules of leguminous plants.
Acta Chem. Scand. 8, 1729-1730 (1954)
- VIRTANEN, A.J., T. MOISIO and R.H. BURRIS: Fixation of nitrogen by nodules excised from illuminated and darkened pea plants.
Acta Chem. Scand. 9, 184-186 (1955)
- VIRTANEN, A.J. and J.K. MIETTINEN: Biological nitrogen fixation.
Plant Physiol. III; Inorganic nutrition of plants.
Ed.F.C. Steward, Academic Press New York, 539-668 (1963)
- WERK, O.: Einfluß des Kaliums auf den Schwefelstoffwechsel, Kohlenhydrat- und Eiweißhaushalt (Untersuchungen mit radioaktivem Schwefel).
Kali-Briefe, Fachgeb. 2,7. Folge, Januar 1959
- WILSON, P.W.: The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation.
Madison, Univ. of Wisconsin Press, 197-206 (1940)
- ZELITSCI, J., P.W. WILSON and R.H. BURRIS: The amino acid composition and distribution of ^{15}N in soybean root nodules, supplied ^{15}N -enriched N_2 .
Plant Physiol. 27, 1-7 (1952)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Konrad Mengel, sehr herzlich danken für die freundliche Überlassung des Themas und für die stets gewährte großzügige Förderung.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Koch für seine zahlreichen wertvollen Anregungen, Hinweise und großzügige Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt Bünthof, insbesondere Herrn Dr. Haeder für die Hinweise bei den Isotopenarbeiten und Herrn Dr. Trolldenier bei den mikrobiologischen Fragen.

Nicht zuletzt sei hier auch der KALI und SALZ AG, Hannover, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

Lebenslauf

Am 16. Mai 1941 wurde ich als Sohn des Obersten a.D. Ali Haghparast-Tanha und seiner Ehefrau Marjam geborene Fikuhi in Rascht/IRAN geboren.

Im Jahre 1960 bestand ich an dem Gymnasium "Mohammad, Reza-Schah-Pahlawi" in Mahabad (Naturwissenschaftlicher Zweig) das Abitur.

Im August 1964 kam ich nach Deutschland, wo ich zunächst vom April 1965 bis März 1966 das Studienkolleg in Darmstadt besuchte. Im April 1966 begann ich mit dem Studium der Landwirtschaft an der Justus-Liebig Universität in Gießen, das ich im Oktober 1970 mit dem Staatsexamen abgeschlossen habe.

Für mein landwirtschaftliches Praktikum habe ich während der Studienzeit ein Semester Urlaub genommen. Ich übte es vom April 1968 bis Oktober 1968 in Tannhof in Roding/Oberpfalz aus.

An der Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt Bünthof in Hannover begann ich im November 1970 mit meiner Doktorarbeit über das vorgelegte Thema.

